

# Kémiai Közlemények

**60**

kötet

**1-2**

Főszerkesztő  
Beck Mihály

Akadémiai Kiadó, Budapest 1983

KEKOAS 60 (1-2) 1-196 (1983)

# KÉMIAI KÖZLEMÉNYEK

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA  
KÉMIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK FOLYÓIRATA

60. KÖTET 1—2. SZÁM

Főszerkesztő:

BECK MIHÁLY

Szerkesztő:

CSÁKVÁRI BÉLA

A szerkesztő bizottság tagjai:

HARDY GYULA, HOLLÓ JÁNOS, LENGYEL BÉLA,  
PUNGOR ERNŐ, SCHAY GÉZA, SZABÓ ZOLTÁN,  
SZÁNTAY CSABA, TUDÓS FERENC

A Kémiai Közlemények változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Egy kötet általában két füzetből áll. Évente két kötet kerül kiadásra.

A folyóiratban a Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Tudományok Osztályán, bizottságaiban és munkabizottságaiban, ill. akadémiai rendezvényeken elhangzott kémiai előadások, továbbá egy-egy tudományág újabb eredményeit kritikailag összefoglaló közlemények kerülnek közlésre.

A kéziratokat a 48. kötet 277—278. oldalán közölt Tájékoztató szerint elkészítve, valamint 5—15 soros magyar és angol nyelvű összefoglalással ellátva CSÁKVÁRI BÉLA, 1088 Budapest, Múzeum körút 6—8. címre kell beküldeni.

A Kémiai Közlemények előfizetési ára kötetenként 100 forint. Belföldi megrendelések az Akadémiai Kiadó (1363 Budapest, Alkotmány u. 21. Pénzforgalmi jelzőszám: 215—11488), külföldi megrendelések a KULTURA Külkereskedelmi Vállalat (1389 Budapest, Fő utca 32. Pénzforgalmi jelzőszám: 218—10990) útján eszközölhetők.



## SZTÉRIKUS HATÁSOK A BIOMOLEKULÁKBAN

### Előszó

Fenti címmel a Magyar Kémikusok Egyesülete az MTA Anyag- és Molekulaszerkezeti Munkabizottság támogatásával 1981. október 5—8. között szimpóziumot rendezett Egerben. A körülbelül nyolcvan résztvevő fele Európából, fele Magyarországról érkezett. A rendezőbizottság (MÉSZÁROS ZOLTÁN tiszteletbeli elnök, KÁLMÁN ALAJOS, NÁRAY-SZABÓ GÁBOR titkár, POLGÁR LÁSZLÓ, SIMON KÁLMÁN és SOHÁR PÁL) célja az volt, hogy olyan kutatókat hozzon össze, akik bemutatják a különböző elméleti és kísérleti módszerek együttes alkalmazását különleges biokémiai problémák megoldására. Bár az ilyen típusú, interdiszciplináris megközelítési mód egyre általánosabb a szerkezeti kémiában, eddig viszonylag kevés a biokémiai példa.

Az előadások és poszterek a röntgendiffrakció, a nagyfrekvenciájú NMR-spektroszkópia, a CD-spektroszkópia és az elméleti módszerek alkalmazásaival foglalkoztak. A tárgyalt témák a kis molekulákban fellépő jelenségektől (pl. antibiotikumok, peptid-hormonok és más, farmakológiailag aktív vegyületek) a fehérjékig (pl. aminosavak megkülönböztetése a tRNS aminoacilezésében, enzimkatalízis mechanizmusa) és a nukleinsavakig (a térbeli hozzáférhetőség és az elektrosztatikus potenciálok közötti párhuzam a DNS-ben és a tRNS-ben) terjedő témákat öleltek fel.

Az alábbi cikkek, valamint még néhány poszter anyaga megjelent angol nyelven az Akadémiai Kiadónál *Steric Effects in Biomolecules* (szerk.: NÁRAY-SZABÓ G.) címmel. A magyar fordítás közreadásától azt reméljük, hogy a hazai érdeklődők szélesebb köreihez is eljuttathatjuk az anyagot és áttekintést adhatunk a szerkezeti biokémiai kutatások néhány újabb eredményéről és irányzatairól.

A Szervező Bizottság és valamennyi résztvevő nevében hálámat fejezem ki az anyagi támogatásért a CHINOIN Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyárának, az EGYT Gyógyszervegyészeti Gyárnak és a Bruker Analytische Messtechnik cégnek. Köszönöm a technikai segítséget a MTA Központi Kémiai Kutató Intézetének. Végül köszönetet mondok HORVÁTH KÁROLYNAK és SIMON KÁLMÁNNAK az előadások fordításáért, SIMON KÁLMÁNNAK külön megköszönöm a kézirat szerkesztését is.

NÁRAY-SZABÓ GÁBOR

## TÉRBELI HATÁSOK — A MOLEKULÁN BELÜLI INFORMÁCIÓÁTVITEL TETRACIKLIN ANTIBIOTIKUMOKBAN

JOHN. J. STEZOWSKI

(*Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart,  
Pfaffenwaldring 55, D-7000 Stuttgart 80, NSZK*)

### Bevezetés

A térbeli kölcsönhatások fontos szerepet töltenek be a természetben és így az emberiség létezésére sokféle szempontból befolyást gyakorolnak. A legegyszerűbb molekula a  $H_2$  konformációs tulajdonságai: a kötéstávolság és a van der Waals-sugár a szubatomi részecskék térbeli kölcsönhatásából következik. A térbeli hatásoknak lényeges szerepük van abban, hogy nem érvényes a reális gázokra az ideális gáztörvény szigorúan. A térbeli hatások előre nehezen megjósolható összetett módon befolyásolják a kémiai reakciók menetét.

Biológiai rendszerekben a térbeli hatások alapvetően fontosak. Sokféleképpen vesznek részt az információ átvitelben is. Intramolekuláris szinten például a fehérjékben térbeli hatások befolyásolják a polipeptid lánc hajlását, ennek következtében alakul ki aktív hellyel bíró rendkívül hatásos katalizátor, az enzim. Intermolekuláris szinten a térbeli hatások fontosak abból a szempontból is, hogy potenciális szubsztrát molekulák és enzimek kölcsönhatásba lépnek-e, hogy létrehozzanak, vagy megakadályozzanak egy adott kémiai reakciót. A térbeli kölcsönhatások fehérjenukleinsav kölcsönhatásokat is befolyásolnak.

A térbeli hatások gyakran nyilvánvalóak. Könnyű megjósolni, hogy egy kiválasztott észtert egy adott észteráz nem fog hasítani, mert a szubsztrát térbelileg inkompatibilis az enzim aktív helyével. Más esetekben a térbeli hatások rejtettek, mégis alapvető szerepet játszhatnak fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságok szempontjából. Ezekben az esetekben a térbeli kölcsönhatások szerepének felismerése nehéz, és csak átfogó, a biológiai adatok elemzésével összekapcsolt szerkezeti tanulmányokkal tisztázható.

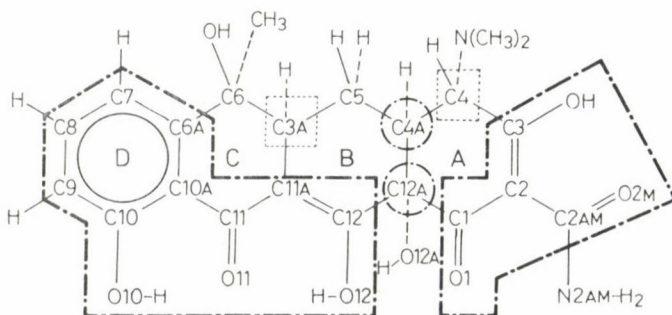
### Tetraciklinek szerkezetének vizsgálata

Széles körű vizsgálatokat folytattunk a tetraciklinek szerkezeti tulajdonságaival kapcsolatban, melyek közül számos vegyület gyógyszerészetileg fontos széles spektrumú antibiotikum. Ezzel a munkával már annyira előrehaladtunk, hogy a bakteriológiai



kísérletekből származó számos megállapítás a kémiai szerkezet, konfiguráció, konformáció és kémiai környezet közötti kölcsönhatások alapján megmagyarázható. Ezeket a megállapításokat abból a célból is értelmezzük, hogy megmutassuk a különleges intramolekuláris térbeli kölcsönhatások a kérdéses származékok fizikai tulajdonságait biológiailag jelentős módon befolyásolják.

Vizsgálataink kezdetén nagymennyiségű bakteriológiai adat állt az irodalomban rendelkezésre [1], ismeretes volt az is, hogy a kémiai szerkezet melyik részét lehet módosítani az antibakteriális hatás megváltozása nélkül [1, 2]. Az 1. ábra az ismert szerkezet-hatás összefüggést mutatja be vázaltszerűen. Feltüntettük az ábrán a szokásos atomszámozást és gyűrűmegjelölést is.



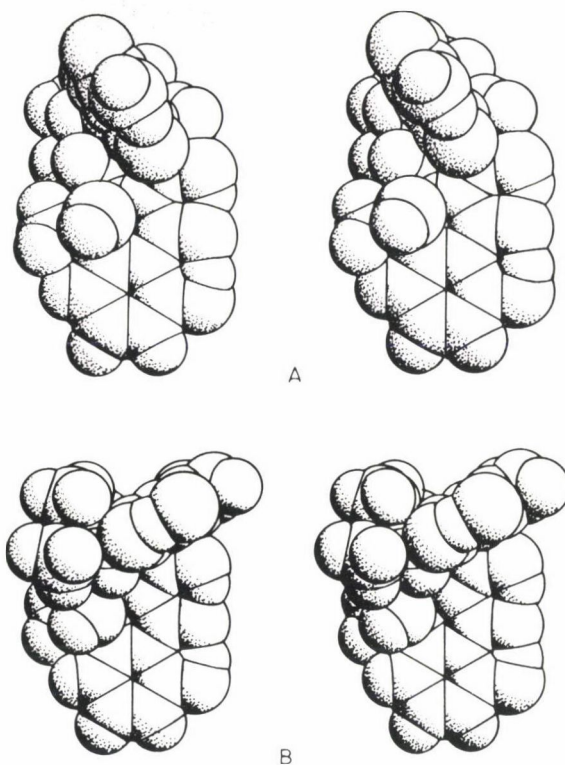
1. ábra. A tetraciklin család alapmolekulájának szerkezeti képlete. A bakteriológiai vizsgálatokon alapuló biológiai hatás-kémiai szerkezet összefüggéseket a molekulán az alábbi vonalakkal jelöljük: a - - - - - jelöléssel körülhatárolt rész az antibakteriális aktivitás szempontjából fontos; a . . . jelöléssel körülhatárolt rész az *in vivo-in vitro* hatékonyság arányát befolyásolja

A tetraciklin gyűrűrendszer néhány jellegzetességéről említést kívánunk tenni. A molekula számos, a környezeti behatásokra érzékeny funkciós csoportot tartalmaz: *a*) az igen savas A-gyűrű kromofort, *b*) valamivel kevésbé savas BCD kromofort, *c*) egy bázikus részt (rendszerint dimetil-amino csoportot). Következésképpen a molekula amfotér, az egyes molekulák töltése az egyvegyértékű kationtól a háromvegyértékű anionig változik. Van a molekulában néhány királis centrum, melyeknek sztereokémiája befolyással van az antibakteriális aktivitásra.

A tetraciklineket rendszerint per orálisan, hidroklorid vagy más só formájában adagolják. A molekulák főleg a bél traktusban abszorbeálódnak, ahol a szabad bázis az uralkodó forma. Fontos lehet fiziológiailag az egyvegyértékű anion, különösen ha kétvegyértékű alkáli földfém, mint pl.  $Mg^{2+}$  van jelen.

Vizsgálataink első eredményei szerint [3] ugyanazon tetraciklin származék szabad bázis formában két különböző kémiai szerkezetet (tautomer formát) vesz fel: A nem-ionizált és az ikerionos formát. Az előbbi csaknem vízmentes oldószerből, az utóbbi viszont nagy víztartalmú oldatból kristályosodik. A kérdéses tetraciklin az 5-oxitetraciklin (OTC) a tetraciklin család fontos tagja.

A két molekula konformációja igen különböző. Az ikerion esetében észlelt ún. *A* konformáció (rokon) az OTC hidroklorid só [4] és a 7-klórtetraciklin esetében tapasztalttal [5]. Ez a konformáció összhangban van a gyógyászatiilag fontos tetraciklin származékok semleges és savas vizes oldataiban végzett cirkuláris dikroizmus méréseivel [6]. Az ionizálatlan molekula az ún. *B* konformációban van, melyet az enolos formában levő A-gyűrű kromofor igen rövid hidrogénhídja jellemez. Rámutattunk arra is [3], hogy ionizálatlan szabad bázis kémiai szerkezete és konformációja következtében lipid oldékonyabb, mint az ikerion. A két különböző konformáció sztereo-vetülete a 2. ábrán látható.



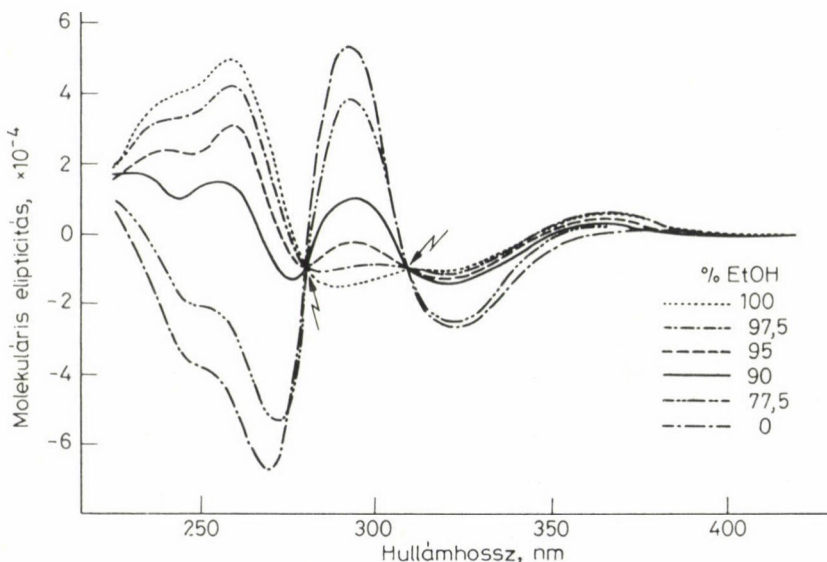
2. ábra. A krisztallográfiai koordinátákon alapuló térkitöltő modellek sztereo ábrái. A felső modell az 5-oxitetraciklint ábrázolja *A* konformációban, ikerionos tautomer formában. Az alsó vetület ugyanazt a tetraciklint *B* konformációban ábrázolja a nem ionizált szabad bázis tautomer forma esetében

A tetraciklinekkel kapcsolatos vizsgálataink előrehaladásával nyilvánvalóvá vált, hogy sok fizikai, kémiai és biológiai tulajdonság kapcsolatban van a szabad bázis két formájának kémiai szerkezetével és konformációjával. Fontosnak érezzük, *a)* a két konformáció egységére, *b)* a két forma közötti egyensúlyi állapotra külön felhívni a figyelmet.



Mint ahogy az várható volt az *A* konformációt az  $\alpha$ -6-dezoxi-5-oxitetraciklin hidroklorid és hidrobromid kristályszerkezet meghatározásánál észleltük [7]. Az előzőleg kémiai úton megállapított abszolút konfiguráció helyességét a röntgendiffrakciós analízis is megerősítette. A *B* konformációt a nem-ionizált OTC egy második kristály módosulatában [8] és a teljesen szintetikus nem-ionizált *N-terc*-butil-8-metoxi-6-dezmetil-6-dezoxitetraciklin szabad bázis esetében észleltünk [9].  $^1\text{H}$  NMR adatok [8] további bizonyítékot szolgáltatottak a két konformer és a szerkezet-konformáció kölcsönhatás létezésére.

A két forma közötti egyensúly fennállásának bizonyításához oldat vizsgálatokra volt szükség. A cirkuláris dikroizmus módszert választottuk, mert egyrészt a spektrumok érzékenyek a konformáció változására, másrészt alacsony koncentrációjú oldatok is mérhetők; a szabad bázis gyengén oldódik vízben. Az OTC szabad bázis oldószerfüggő CD spektrumai (3. ábra) meggyőzően bizonyítják, hogy a különböző konformációjú molekulák között környezetfüggő egyensúly áll fenn [10].



3. ábra. Az 5-oxitetraciklin szabad bázis cirkuláris dikroizmus spektrumai változó összetételű etanol/víz oldószer rendszerben. A relatív oldószer arányt az etanol %-ban adjuk meg. A nyilakkal jelölt két izobesztikus pont jelenléte arra utal, hogy ugyanazon vegyület két molekuláris konformerje között egyensúly áll fenn

A tetraciklin származékok közül a 4-epimerek szokatlan antibakteriális aktivitással bírnak. Például a 4-epi-OTC kis *in vitro* antibakteriális aktivitást mutat, de *in vivo* az aktivitás hasonló az OTC-nél tapasztaltnak. A tetraciklinekről szóló első munkánkban felhívtuk arra a figyelmet, hogy a 4-epimerek sztérikus okok miatt nem

veszik fel a *B* konformációt [3]. Ezért megpróbáltuk a 4-*epi*-OTC-t olyan körülmények között kristályosítani, ahol várhatóan a nem-ionizált kémiai szerkezet az uralkodó forma. Vizsgálataink során számos érdekes megállapítást tettünk: *a*) a 4-*epi*-OTC oldhatósága lipofil oldószerekben igen alacsony (vékonyréteg kromatográfiásan nem mutatható ki); *b*) olyan oldószerszerrendszerből melyben az OTC várhatóan nem-ionizált formában kristályosodik (1 : 1 etanol : diklórmétán) ikerionos 4-*epi*-OTC-t kaptunk; *c*) egy 4-*epi*-OTC minta meleg lipofil oldószerszerrel hosszas érintkezés után valószínűleg átalakult OTC-vé. Ezek a megfigyelések kielégítő magyarázatot adnak a 4-epimerек szokatlan biológiai viselkedésére. Az *in vitro* nélküli *in vivo* aktivitást a származékok reepimerizációjával értelmezzük, a szerkezet lipofil részében végbemenő átalakulás eredménye a *B* konformációjú nem-ionizált alap tetraciklin [11]. Ezek a megfigyelések indítottak el bennünket abban az irányban, hogy a kémiai szerkezet, konformáció, konfiguráció problémáinak bevonásával a szerkezet-aktivitást molekuláris szinten tanulmányozzuk.

A kémiai szerkezet és konfiguráció változtatásának a konformációra gyakorolt hatását néhány 7-klórtetraciklin [12] és 6-tiatetraciklin kristály szerkezetének meghatározásával tanulmányoztuk [13]. Az alapvegyületek 7-klórtetraciklin (7-CITC) és 6-tatetraciklin (6-STC), az utóbbiban endociklusos kén atom helyettesíti a C6 atomot, széles spektrumú, jó *in vivo* és *in vitro* aktivitású antibiotikumok.

A nem-ionizált 6-STC szabad bázis kristályszerkezet vizsgálata a várt *B* konformációt eredményezte, az A gyűrű és a BCD kromofor kötésviszonyai a nem-ionizált OTC-re emlékeztetnek. A nem-ionizált 7-CITC szerkezetvizsgálata még nem készült el, de nincs okunk feltételezni, hogy a kötésviszonyok és a konformáció lényegesen különböznenek az OTC-től.

A 7-CITC és 6-STC 5a-epimerек különösen érdekesek a mi szempontunkból. Mindkét származék hasonló *in vitro* antibakteriális aktivitást mutat, mint az alapvegyület, ugyanakkor az *in vivo* aktivitás lényegesen kisebb. Az 5a-*epi*-7-CITC. HCl kristályszerkezet vizsgálata szerint a kation a nem várt *B* konformációban van. Ez a megfigyelés legegyszerűbben úgy értelmezhető — figyelembe véve a biológiai adatokat is —, hogy az 5a-epitetraciklinek sokkal lipofilebbek, mint az alapszármazékok és ezért *in vivo* olyan mértékben abszorbeálódnak, hogy ez akadályozza meg az antibakteriális aktivitást. Ezt az értelmezést, azonban az 5a-*epi*-6-STC és a 6-STC-re végzett lipofilitás mérések nem támasztották alá [13]. Az utóbbi lipofilebb az előbbinél, de ez utóbbi a hatékony antibakteriális szer. Ezért azt a végkövetkeztetést vonhatjuk le, hogy az 5a-epimerек *B* konformációban való megjelenése valószínűleg a transzport fehérjékhez való kötődést eredményezi. Feltételezzük, hogy az *A* konformációjú ikerionos formának a fehérjétől (pl. szérum albumin) való elszakadásban van — eddig még nem tisztázott — szerepe.

A 6-os helyen történő epimerizáció is néhány érdekes hatást vált ki. Például az  $\alpha$ -6-dezoxi-5-oxitetraciklin jelentősen lipofilebb mint a  $\beta$ -6-dezoxi-5-oxitetraciklin. A biológiai aktivitás különbség pedig olyan, hogy az  $\alpha$ -származék fontos gyógyászati szempontból, epimerje viszont nem.



A dehidro-7-klórtetraciklin, DH-7-CITC különösen érdekes tetraciklin származék, mert számos tautomer szerkezet kialakulására van lehetőség [12]. A DH-7-CITC-nek nincs túl erős antibakteriális hatása, a 6-epimerje viszont aktív vegyület [1].

Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -dezoxi-5-oxitetraciklinek viszonylagos lipofilitása könnyen magyarázható a B konformációval és a C6 atomon és az A-gyűrűn levő szubsztituensek különösen a 4-es pozícióban levő hidrogénatommal való térbeli kölcsönhatással [3]. Bár a mechanizmus nem olyan egyértelmű feltételezzük, hogy a DH-7-CITC és a 6-*epi*-DH-7-CICT közötti antibakteriális aktivitás különbség is hasonló térbeli kölcsönhatásokkal magyarázható.

Eddigi tetraciklin vizsgálataink igazolták, hogy a fiziológiásan fontos szabad bázis két formában van jelen, melyek egymással biológiailag is fontos egyensúlyt képeznek, bebizonyítottuk, hogy mindegyikhez egy-egy meghatározott konformáció tartozik, melyek jelenlétét oldatban és kristályos állapotban egyaránt sikerült kimutatni. Számos bizonyíték van arra nézve is, hogy egy adott származék antibakteriális hatását erősen befolyásolja az, milyen arányban van jelen a két forma fiziológiás körülmények között.

Azt gondoljuk, hogy krisztallográfiai vizsgálataink felvilágosítást adtak arra nézve is hogyan befolyásolja a kétféle forma megjelenését az 5-ös, 6-os, 7-es helyeken végrehajtott szubsztitúció. Vizsgálataink feltártak olyan térbeli kölcsönhatásokat, melyek nézetünk szerint olyan intramolekuláris információ átvitelt váltanak ki, mely azután az egyensúly környezettől való függését befolyásolja, és ezáltal erősen hatást gyakorol egy adott származék antibakteriális tulajdonságaira.

Ez az elmélet a következő elveken alapszik: *a)* az alap tetraciklin esetében a szabad bázis izolált molekula kis energiájú formája a kémiai szerkezet és a konformáció szempontjából a nem-ionizált alak és nem az ikerionos forma; *b)* a környezeti hatások, különösen a hidratálódás (és/vagy a protonálódás) elegendő energiát adnak ahhoz, hogy A konformációban ikerionos szerkezet alakulhasson ki; *c)* mindkét forma fontos biológiai szempontból; *d)* a 6-os hely és a 4-es hidrogénatom térbeli kölcsönhatása erősen befolyásolja a két tautomer forma közötti energia különbséget.

Ez az elmélet, mely kristályszerkezet és cirkuláris dikroizmus vizsgálatainkon és kísérleti antibakteriális adatokon alapszik további oldat vizsgálatokkal tehető próbára. 5, 6 és/vagy 7 pozícióban szubsztituált, 5a helyen különböző sztereokémiájú tetraciklin származékok egyensúlyának oldószer függését kellene megmérni. A tetraciklinnel összehasonlítva a következőkre számíthatunk:

1. 5-oxitetraciklin származékok egy bizonyos százalékos víztartalom esetén a nem-ionos tautomer formát részesítik előnyben;

*a)* a sorrend  $\alpha$ -6-dezoxi-6-oxitetraciklin  $\gg$  5-oxitetraciklin  $>$   $\beta$ -6-dezoxi-5-oxitetraciklin;

2. A 7-klórtetraciklin is mutat bizonyos hajlamot a nem-ionizált formára, ez azonban kisebb mint az 5-oxitetraciklin esetében és csaknem bizonyos, hogy nagyobb, mint a  $\beta$ -6-dezoxi-5-oxitetraciklinnél.

3. A 6-tiatetraciklin és a 6-dezmetil-6-dezoxitetraciklin várhatóan hasonló tulajdonságot mutat és a nem-ionizált formát kedvezményezi.

4. A fentiek közül az 5a-epimerek esetében várható a legnagyobb egyensúlyi állandó eltolódás a nem-ionizált forma javára.

5. A 6-metiléntetraciklin várhatóan hasonlóképpen viselkedik, mint a 6-dezmetil-6-dezoxi-tetraciklin.

Javasoljuk ennek a rendszernek gondos elméleti vizsgálatát abból a célból, hogy meghatározzuk azt az energia különbséget, amelyik szerintünk az intramolekuláris információvitelt váltja ki. Célszerűen ezek a vizsgálatok a kristályszerkezet meghatározások megfigyeléseiből indulhatnak ki. Ezek a megfigyelések a következők:

1. Az  $\alpha$ -6-szubsztituens a tetraciklinben és 5-oxitetraciklinben axiális, de a 7-klórtetraciklinben átmeneti helyzetű.

2. A nem-ionizált 5-oxitetraciklinben a C5—C6a kötés szokatlanul hosszú (156 pm), az 5OH és a 6-metil csoportok *peri* kölcsönhatása következtében. Valószínűleg az  $\alpha$ -6-dezoxi-5-oxitetraciklin esetében is hosszú ez a kötés, de nem a  $\beta$ -sztereomernél.

3. 5-oxitetraciklinekben figyelembe kell venni az intramolekuláris hidrogénhidat az 5-ös és 12-es pozícióban levő hidroxilcsoportok között.

4. Olyan modellek, melyek csak a B, C, D-gyűrűt veszik figyelembe, nem megfelelőek, mert a B konformerű nem-ionizált szerkezetének stabilitása szempontjából az A-gyűrű kromoforban levő rövid hidrogénhid fontos tényező.

#### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom R. PREWONAK, K. H. JOGUNNAK, R. KIRCHLERHNERNEK, P. KOLLATNAK, L. J. HUGHESNAK és R. E. HUGHESNAK a munkához nyújtott értékes segítségért. A Stuttgarti Egyetem Szerves Biokémiai és Izotópkutató Intézet támogatása tette lehetővé a munka elvégzését.

#### Összefoglalás

Számos, gyógyászati lag fontos antibiotikumot magában foglaló tetraciklin szerkezeti tulajdonságairól adunk számot. Ezek az információk lényegesek ahhoz, hogy a szerkezet hatás adatokat a kémiai szerkezet, konformáció és konfiguráció közötti kapcsolatok alapján megértsük.

#### Summary

A comprehensive study of the structural properties of the tetracyclines, a number of which are medically important antibiotics, is providing information directly relevant to the development of an understanding of structure-activity data in terms of interrelationships between chemical structure, conformation and configuration.



## IRODALOM

1. R. K. BLACKWOOD, A. R. ENGLISH, *Adv. Appl. Microbiol.*, *13*, 237—266 (1970).
2. W. DÜRKHEIMER, *Angew. Chem.*, *87*, 751—784 (1975).
3. J. J. STEZOWSKI, *J. Am. Chem. Soc.*, *98*, 6012—6018 (1976).
4. H. CID-DRESDNER, *Z. Kristallogr.*, *121*, 170—189 (1965).
5. J. DONOHUE, J. D. DUNITZ, K. N. TRUEBLOOD, M. S. WEBSTER, *J. Am. Chem. Soc.*, *85*, 851—856 (1963).
6. L. A. MITSCHER, A. C. BONACCI, T. D. SOKOLSKI, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 78—86 (1969).
7. J. J. STEZOWSKI, *J. Am. Chem. Soc.*, *99*, 1122—1129 (1977).
8. R. PREWO, J. J. STEZOWSKI, *J. Am. Chem. Soc.*, *99*, 1117—1121 (1977).
9. B. GLATZ, G. HELMCHEN, H. MUXFLEDT, H. PORCHER, R. PREWO, J. SENN, J. J. STEZOWSKI, R. J. STOJDA, D. R. WHITE, *J. Am. Chem. Soc.*, *101*, 2171—2181 (1979).
10. L. J. HUGHES, J. J. STEZOWSKI, R. E. HUGHES, *J. Am. Chem. Soc.*, *101*, 7655—7657 (1979).
11. R. PREWO, J. J. STEZOWSKI, *J. Am. Chem. Soc.*, *101*, 7657—7660 (1979).
12. R. PREWO, J. J. STEZOWSKI, *J. Am. Chem. Soc.*, *102*, 7015—7020 (1980).
13. R. PREWO, J. J. STEZOWSKI, R. KIRCHLECHNER, *J. Am. Chem. Soc.*, *102*, 7021—7026 (1980).

## ENNIATIN ÉS VALINOMICIN SORBA TARTOZÓ ANTIBIOTIKUMOK VIZSGÁLATA: AZ ENNIATIN B SEGÍTSÉGÉVEL TÖRTÉNŐ ION SZÁLLÍTÁS SZERKEZETI SZEMPONTJAI

B. K. VAINSTEIN, G. N. TISCSENKO, N. E. ZSUKLISZTOVA, A. I. KARAULOV,  
V. I. SZMIRNOVA

(*Institute of Crystallography, Academy of Sciences of USSR, Moszkva 117 333, Szovjetunió*)

### Bevezetés

Az enniatin és valinomicin antibiotikumok gyűrűs hexa- és dodekadepszipeptid<sup>\*</sup>, melyek alternáló amino- és hidroxisav részekből épülnek fel. Az ionoforoknak nevezett antibiotikumok szerepe abban van, hogy alkáli és alkáli földfémek biológiai membránon való áthaladását segítik elő. Az ebbe a típusba tartozó antibiotikumok hatásmechanizmusának felderítése céljából szerkezetvizsgálatokat végeztünk.

A biológiai aktivitásért felelős konformációs sajátosságok tisztázására az enniatin B és a valinomicin különböző analógjait, így sztereoisomerjeiket, polimerhomológjaikat, amino és hidroxisav csoportokban helyettesített származékaikat vizsgáltuk. Az analógok tanulmányozása cisz és transz konfigurációjú amino- és hidroxisav csoportok, peptid és észter csoportok konformációs képességeinek feltárását teszi lehetővé. Kristályos halmazállapotú gyűrűs rendszerek vizsgálata pontos szerkezeti paramétereket szolgáltat, melyek ilyen peptid és depszipeptid rendszerek tulajdonságainak oldatbeli tanulmányozására és elméleti számításokra használhatók fel. Fontos, hogy a kristálybeli konformációt összehasonlítsuk az oldatban kapottal abból a célból, hogy választ kapjunk arra a régi problémára: mennyire vihetők át a kristályos állapotban kapott eredmények olyan oldatokra melyekben a molekula hatását kifejti. A fenti problémákat különböző gyűrűnagyságú (6-tól 36 tagú), nagyszámú vegyületen elemezzük.

### Dipeptidek és didepszipeptidek

Cisz konfigurációba kényszerített peptid és észter csoportot tartalmazó 6-tagú dipeptidek és didepszipeptidek tanulmányozása során számos érdekes szerkezeti sajátosságot találtunk [1—5]. Elsősorban egy szófa vagy félszék konformációjú l. 1.

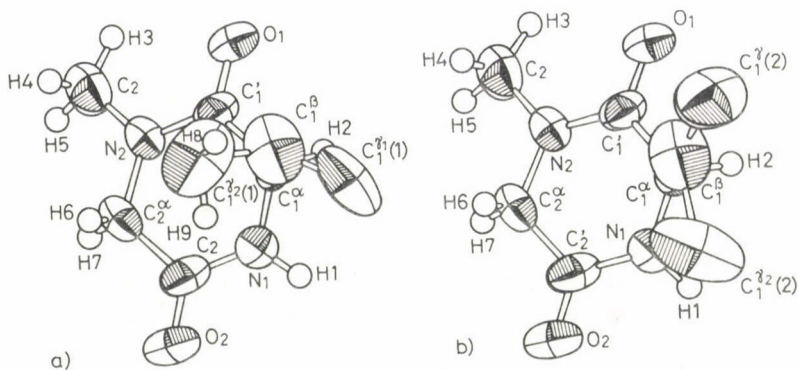
\* A Depszipeptidek amino- és hidroxisavat tartalmazó vegyületek.



ábra, első ciklikus didepsziptid a ciklo[-D-MeVal-D-Hyi-]\* röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatáról adunk számot [2, 3]. A szokatlan konformáció megjelenését a valin *N*-metilezésével hozzuk kapcsolatba. A szokásos szék konformációt találjuk a dezmetil anológban, a ciklo[-Val-Hyi-] [5] és két gyűrűs dimetilezett dipeptidben [8, 9].



1. ábra. A ciklo[-D-MeVal-D-Hyi-] molekula konformációja



2. ábra. A ciklo[-L-Val-Ser-] molekula két konformációja (a és b) melyek 3 : 1 arányban fordulnak elő a kristályszerkezetben

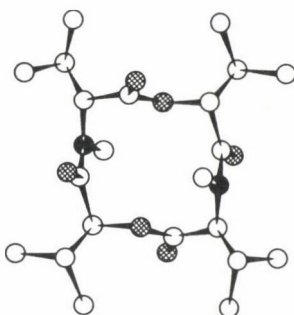
A ciklo[-Val-Ser-] [1, 4] szerkezetében 3 : 1 arányban két konformer elegyét találjuk, a két téralkat az izopropil csoport irányítottságában különbözik  $\chi = -60^\circ$ , illetve  $180^\circ$ , l. 2. ábra. Az utóbbinak „zászlórúd” téralkata van.

Végül a ciklo[-L-Val-L-Hyi-] szerkezetében a négy kristallográfiailag független molekulát összekapcsoló szuperszimmetriára mutattunk rá [5]. A nemkristallográfiái szimmetria elemek a kristallográfiákkal együtt szuper-szimmetria cellát hoznak létre.

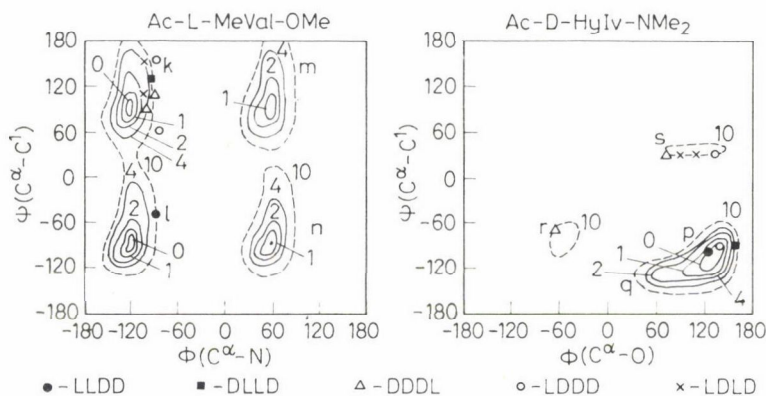
\* Hyi hidroxiiizovaleriánsavat jelöl.

## Tetradepsziptidek

L és D konfigurációjú elemekből álló [10—16] ciklo[-(MeVal-Hyi)<sub>2</sub>-] tetradepsziptid sztereoizomerjeinek vizsgálata szerint a felváltva, cisz-peptid és transz-észter kötésekkel tartalmazó vegyületek konformációja stabilis [6, 10—15, 17], míg az LDLD sztereoizomer, új típusú konformációt mutatott, mivel az összes kötés transz és a molekulának szimmetria centruma van [16], l. 3. ábra. Ennek a téralkatnak a



3. ábra. A ciklo[-L-MeVal-L-Hyi-D-MeVal-D-Hyi] molekula konformációja



4. ábra. A ciklo[-(MeVal-Hyi)<sub>2</sub>-] sztereoizomerjei konformációjának összehasonlítása. A modell vegyületekre feltüntettük a konformációs térképen  $\phi$ ,  $\psi$  kísérleti pontokat. A D-MeVal és D-Hyi tagokra az áttükrözött pontokat adjuk meg

kialakulása maga után vonja a MeVal rész konformációjának megváltozását, valamint az amid és észter csoportoknak a síkaltatól való jelentős eltérését ( $\omega$  szög 161, illetve 170°). A dihidroklamidocin [18] szerkezetében C<sub>2</sub>-es szimmetriát és transz kötésekkel találtunk.

A ciklo[-L-MeVal-D-Hyi]<sub>2</sub> tetraenniatin [15] molekula konformációt a két másik szerkezeti szempontból tanulmányozott ugyanolyan szénatom konfiguráció



sorrendű ciklo[-(L-MeIle-D-Hyi-L-MeIleu-D-Hyi)<sub>2</sub>-] [19] és ciklo[-(1-MeIle-D-Hyi)<sub>2</sub>-] tetraciklusokkal összevetve megállapítottuk, hogy a gyűrű szimmetriáját az oldallán-cok szimmetriája és elrendeződése határozza meg. A három fent említett gyűrűs vegyület közül az első a legszimmetrikusabb; egy nem-krisztallográfiai kétfogásos szimmetria eleme van. A kísérleti és az elméletileg számított konformációk között összefüggést találtunk [10—15]. Fordított arányosságot találtunk a 12 tagú  $\varphi$ ,  $\psi$  és szögekkel jellemzett gyűrű feszültsége és a lineáris peptidből való képződési hajlam között. A gyűrűfeszültség csökken, ha néhány részt szokatlan konfigurációjúra cseréljük ki (Me-Val részt az LLDD-formában, Hyi-részt az DDDL-ben, LDDD-ben, és az LDDL formában, l. 4. ábra) [16].

### Hexadepsiptidek

Számos 18 tagú depsziptid gyűrűs vegyületet; ionoforokat, antibiotikus hatású enniatin B-t és LDLLDL analógjaikat szabad és fémkomplex formában tanulmányoztuk [18—23].

#### *Enniatin B*

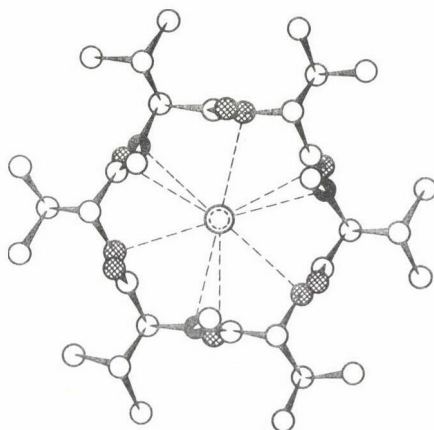
Az Enniatin B molekulának, ciklo[-(MeVal-Hyi)<sub>3</sub>-] vegyületnek a kristályban háromfogásos szimmetriája és egy pszeudo-szimmetriacentruma van, a szerkezet ezen kívül a gyűrű síkjára merőlegesen felfelé-lefelé elhelyezkedő karbonil csoportokkal és pszeudo-ekvatoriális, transz irányítottágú izopropil oldalcsoportokkal jellemezhető (l. 5. ábra). Az *N*-metil-amid és az észter csoportok planáris transz konfigurációjúak. A molekula alakja egy 270 pm belső átmérőjű vastagfalú csészéhez hasonlít. A molekula üreg belső oldalsó felületét a gyűrű atomjai alkotják, a viszonylag vékony aljat az *N*-metilvalin rész metilcsoportjai képezik. A hidroxisav fragmens karbonil oxigén atomjai képezik az üreg poláris szélét, melyet kívülről az izopropil csoportok fednek. Az üreg a poláris szélén 400 pm-re szélesedik. A molekuláris csésze külső lipofil felületét, melyet az izopropil csoport és *N*-metil csoport képez, az *N*-metilvalin részek karbonil oxigén atomjai és kismértékben fedett nitrogénatomok veszik körül.

A molekuláris csésze központjához közel egy vízmolekula található, melynek betöltöttségi faktora,  $Q_{V1}=1,0$ . Fölötte a C<sub>3</sub> tengelyen egy másik vízmolekula  $Q_{V2}=0,5$ -as betöltöttségi faktorral található. A vízmolekulákat erős hidrogénhid kapcsolja össze:  $V1 \dots V2$  262 pm. Így a molekuláris üregben egyforma valószínűség-gel foglal helyet egy vízmolekula vagy súlyzószerűen két hidrogénhidakkal összekapcsolt vízmolekula.

Az enniatin B molekula konformációja annyira tökéletes, hogy bármely alakváltozás a biológiai hatás csökkenésével jár együtt. Így például a dez-*N*-metil analóg, melyben nincsen lipofil alsó rész, inaktív, annak ellenére, hogy fémekkel komplexet képez. Ugyancsak inaktívak a tisztán hidroxisav részeket tartalmazó

analógok. Az építőelemek konfigurációjának megváltoztatása (L-ről D-re, illetve fordítva) ugyancsak csökkenti az aktivitást [24].

A beauvericin molekulában, melyben az izopropil oldalcsoportok helyett fenilcsoportok vannak, az *N*-metil alsó rész kinyílik kissé és a molekuláris üreg a  $C_3$  pseudo-szimmetria tengelyen elhelyezkedő három vízmolekulát tartalmaz oly módon, hogy a központi vízmolekula az üreg centrumában van.



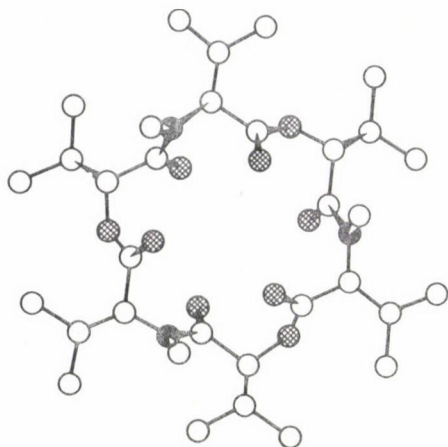
5. ábra. Az enniatin B molekula konformációja

#### *Az Enniatin B Na,Ni-komplexe*

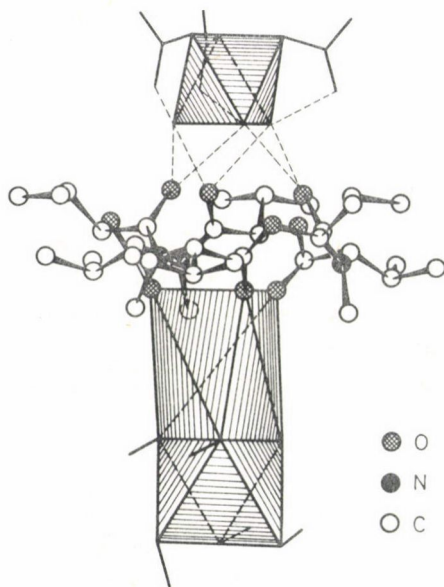
Az enniatin B molekula Na,Ni-komplexének (enniatin B  $\text{NaNi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 1,5 \text{CH}_3\text{OH} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) konformációja, l. 6. ábra [20] különbözik a szabad állapotú molekula téralkatától (5. ábra), bár a molekula a komplexben megőrzi alapvető konformációs sajátosságait. A molekuláris csésze alja kinyílik, és ennek következtében a karbonil oxigénatomok közelebb kerülnek egymáshoz az ún. szírom nyílás (itt záródás) mechanizmus, azaz az amid és észter csoportok síkjainak egyidejű, ellentétes irányú kifordulása következtében.

A komplexképződés hatására az enniatin B molekula konformációja megváltozik, mert az aminosav karbonil oxigénatomjai a nátriumatom koordinációs terébe lépnek, ezzel egyidőben az *N*-metil alsó rész kinyílik, azaz az enniatin B molekula a Na ion erősen oktaéderes torzultságú prizma formájához igazodik. Ezzel együtt a karbonilcsoport oxigénatomjai a nátrium oktaéder vízmolekuláival bifurkális (villaszerű) hidrogénhidakon keresztül kapcsolódnak, l. 7. ábra. A komplex minden szerkezeti eleme (Na-oktaéder, Na-prizma, enniatin B molekula, Ni-oktaéder) egy háromfogásos szimmetria tengely mentén helyezkedik el, az  $I_{23}$  szimmetriájú köbös cella térátlója mentén, ezáltal olyan végtelen oszlop jön létre, melynek periódusa a térátló fele. Az oszlopok térben metszik egymást és térbeli hálót hoznak létre. Mindegyik Na-oktaéder négy egymást metsző oszlop közös eleme.



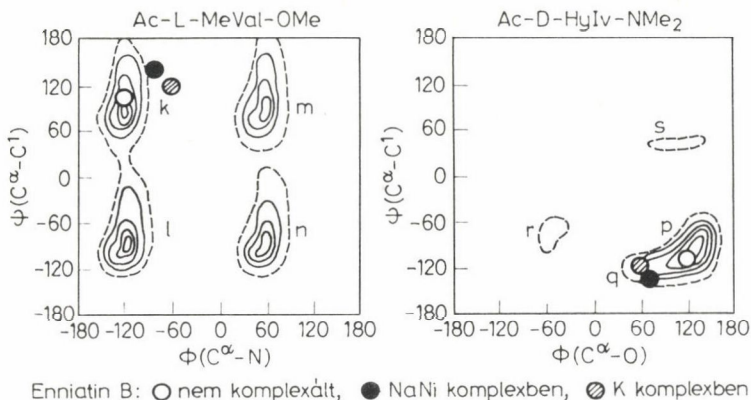


6. ábra. Az enniatin B molekula Na,Ni-komplexének konformációja



7. ábra. Az enniatin B molekula Na,Ni-komplex szerkezeti részlete

Modellvegyületekre számolt konformációs térképeken a  $\varphi, \psi$  pontok eltolódnak (8. ábra), ez arra utal, hogy megváltozik az enniatin B molekula alakja az Na,Ni-komplexbépződés során. A K-komplexre kapott kísérleti pontokat is föltüntettük ugyanezen a térképen, ennél, a komplexnél a fémionok a molekuláris üreg közepén helyezkednek el, az antibiotikum molekulák viszont egymás fölött [26]. Nyilvánvalóan

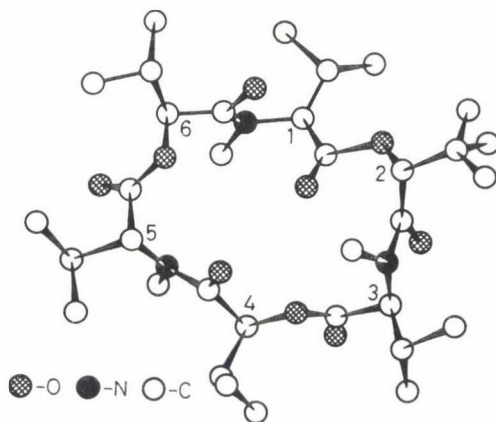


8. ábra. A  $\varphi, \psi$  kísérleti pontok elhelyezkedése a konformációs térképen: ○ enniatin B szabad molekula, ● Na,Ni-komplex, ◐ K-komplex. A D-MeVal és L-Hyi tagokra tükrözött pontok helyét adjuk meg

az antibiotikum molekula komplexképződése során a konformációs változás ugyanolyan K és Na,Ni ionok esetében. Meg kell jegyezni, hogy a K-komplex instabilis, ez a korlátozott diffrakciós képben és a jodid rendezetlenségében nyilvánul meg.

#### Az enniatin B LDLLDL analógja

A három utolsó eltérő konfigurációjú, LDLLDL analóg kristályszerkezetében aszimmetrikus konformációt tapasztaltunk (9. ábra) [21], ez a téralkat közel áll a számított minimális teljes energiához [27]. Az első *N*-Metilvalin rész metil- és karbonilcsoportjai kismértékben leárnýékolják a megnyúlt intramolekuláris üreget. A



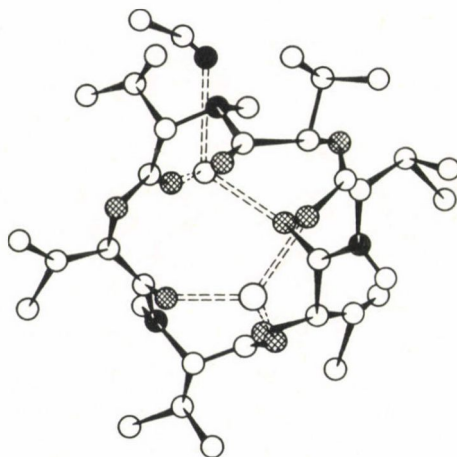
9. ábra. Az enniatin B LDLLDL-analógjának konformációja



gyűrű fő síkjához képest három karbonilcsoport (2,3,5) felfelé-, három (1,4,6) lefelé mutat. A három *N*-metilcsoport közül kettő felfelé, egy (a harmadik taghoz tartozó) lefelé mutat. Az oldalsó csoportok pszeudo-ekvatoriálisak, ezek közül négyben a  $C^{\alpha}H-C^{\beta}H$  fragmens transz, egyben pedig gauche helyzetű. A második egység oldallánca egyforma valószínűséggel foglal el gauche és transz konfigurációt. A molekula külső hidrofób felülete egészében véve nem torzult. Nyilvánvalóan a konformációs flexibilitás következtében a molekula antimikrobiális aktivitása összemérhető az enniatin B-ével [27].

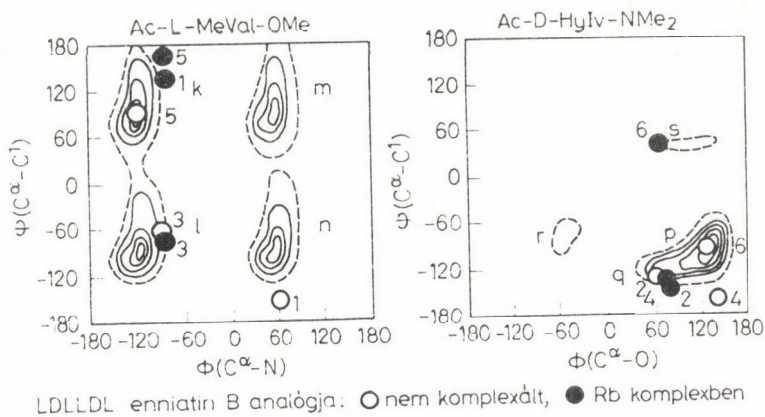
#### *Az enniatin B LDLLDL analógjának rubidium komplexe*

Az enniatin B RbNCS-sel való komplexálódása során a konformáció jelentősen megváltozik (10. és 11. ábra) [22, 23] a szabad állapotú molekulákhoz képest (9. ábra). Mindkét energetikailag legkedvezőbb konformációtól különbözik a komplex téralkata, de közel áll az egyik elméletileg lehetségeshez. A karbonil oxigénatomok pszeudoaxiálisak, az első és a negyedik egységhez tartozó a fő sík egyik oldalán, másik négy a másik oldalon van. Az összes amid és észter csoport transz konfigurációjú. Az oldalcsoportok pszeudoekvatoriális helyzetűek. A  $C^{\alpha}H-C^{\beta}H$  protonok az egy-négy egységekben transz, az ötödikben gauche orientációjúak.

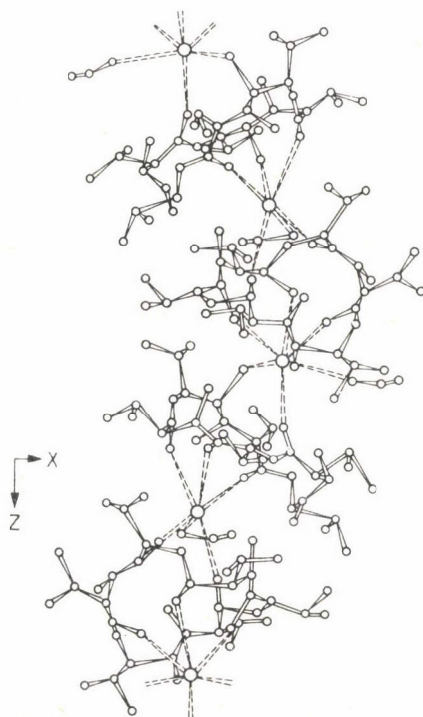


10. ábra. Az enniatin B LDLLDL analóg rubidium komplexének konformációja

A konformációs változás oka az, hogy az antibiotikum molekulák az Rb ionokkal felváltva végtelen helikális pszeudoszendvics komplexet hoznak létre (12. ábra). A rubidium iont öt karbonil oxigénatom (1—5 tag) veszi körül, kismértékben torzult oktaéder formájában, három oxigénatom a felső ciklopepszipeptid molekulához, kettő pedig az alsóhoz tartozik. A hatodik egység karbonilcsoportja (L-Hyi) nem



11. ábra. A  $\varphi, \psi$  kísérleti pontok helye a konformációs térképen: ○ az enniatin B LDLLDL analógja, ● az előbbi rubidium komplexe. A D-MeVal és L-HyI tagokra a tükrözött pontok helyét adjuk meg



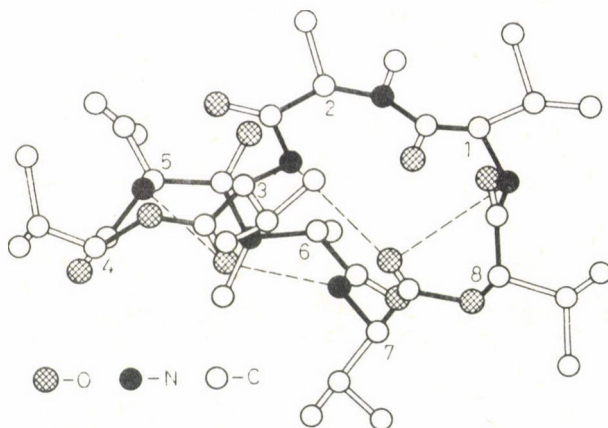
12. ábra. Az enniatin B LDLLDL analógja rubidium komplexének szerkezete

lép kölcsönhatásba a rubidium ionnal, hanem a gyűrű síkjától képest felfelé mutat, és ezáltal a rodanid ion közel kerül a rubidium ionhoz. A hatodik tag karbonilcsoportja orientációjának megváltoztatása konformációs változást okoz, így a  $\varphi$  és  $\psi$  paraméterek a Hyi tagra számolt konformációs térkép (11. ábra) S minimumába esnek.

### Oktapeptidek: [MeAla<sup>2,6</sup>] oktavalinomicin

A [MeAla<sup>2,6</sup>]oktavalinomicin, ciklo[-(D-Val-L-MeAla-L-Val-D-Hyi)<sub>2</sub>-], mely abban különbözik a természetes valinomicintól, hogy mindkét L-Hyi egységet L-MeAla egységre változtattuk, azaz a két észter oxigénatomot N-metil csoportra cseréltük, szerkezetvizsgálatát is elvégeztük [28]. Egy ilyen változtatás nem változtatja meg molekula konformációját, mivel a lehetséges intramolekuláris hidrogénhidakat nem befolyásolja.

A [MeAla<sup>2,6</sup>] oktavalinomicin molekulának nem-krisztallográfiai kétfogásos szimmetria tengelye van, 13. ábra. A gyűrű egy csavart teniszlabda gerezdhez hasonlít,



13. ábra. A [MeAla<sup>2,6</sup>]oktavalinomicin molekula konformációja

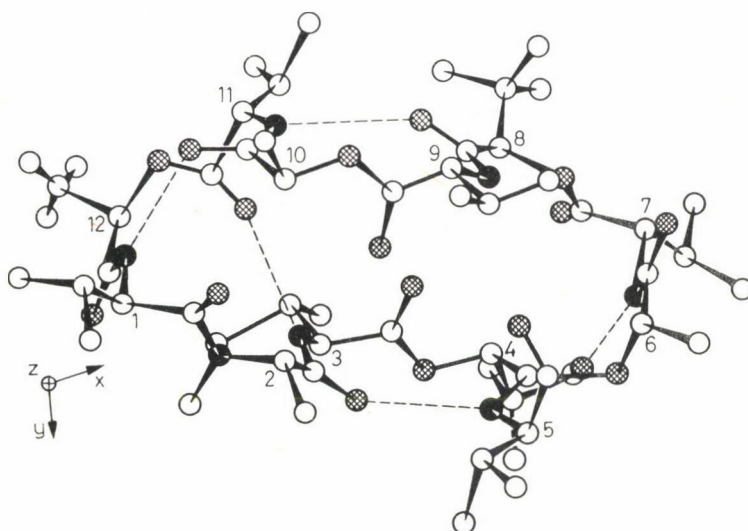
ezt a formát az L-Val tagok közötti 5→1 intramolekuláris hidrogénhid stabilizálja. A tizenhárom-tagú gyűrű konformációs paraméterei a valinomicin és annak [MeAla<sup>2</sup>] analógja gyűrűjének megfelelő paramétereivel egyezik meg [29–31]. A karbonilcsoportok az általuk meghatározott félkörhöz képest pseudoaxiális orientációjúak, közülük három a sík egyik oldala felé irányul, a D-Hyi egységhez tartozó a másik oldal felé. Az összes oldalcsoport pseudoaxiális, transz irányítottágú. Az amid és észtercsoportok síkalkatúak és transz konfigurációjúak. A [MeAla<sup>2,6</sup>]oktavalinomi-



cin intramolekuláris ürege alkalmas Na-ionnal való komplexképzésre. A molekula konformációja lényegesen különbözik más röntgendiffrakcióval tanulmányozott oktapeptidek konformációjától [32–34]. Csaknem biztos viszont, hogy a természetes oktavalinomicin ugyanolyan téralkatú.

### Dodekadepsziptidek: [MeAla<sup>2</sup>]valinomicin

Mint ahogy az várható a [MeAla<sup>2</sup>]valinomicin, ciklo[-D-Val-L-MeAla-L-Val-D-Hyi-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyi)<sub>2</sub>-] [35], melyben a természetes antibiotikumhoz képest egy tejsav részt metilalaninre cseréltünk ki, hasonló téralkatú, mint a valinomicin [29–31]. A molekula elipszoid alakú, a lánc főatomjait pszeudoszimmetriacentrum kapcsolja össze (14. ábra). Mind az amid, mind az észtercsoport síkalkatú és transz konfigurációjú. A 4-es, 8-as és 12-es D-Hyi tagok oldalláncai statisztikusan



14. ábra. A [MeAla<sup>2</sup>]valinomicin konformációja

eloszlatva transz és gauche orientációjúak, a többi oldalcsoport transz helyzetű. Két karbonil oxigénatom az oldallánckok által létrehozott lipofil felület kitett helyén van. Valószínűleg ezek az oxigénatomok indítják be a káliumionnal történő komplexképződést. Az összes amid proton intramolekuláris 1→7 transz II. hidrogénhid képzésben vesz részt. Ellentétben a természetes valinomicinnel a [MeAla<sup>2</sup>] analóg molekulában csak egy 5→1 gyűrűn keresztül létrejövő transz intramolekuláris hidrogénhid van. A második kötés felszakadt, az O...N távolság 347 pm-re nőtt meg,

összehasonlítva ez a távolság a valinomicinben 307 pm. A hidrogénkötés felszakadása kapcsolatban lehet az intermolekuláris erők megváltozásával.

A valinomicin csoport négy konformációs típusa ismeretes. Az első a szimmetrikus „karperec” alakú, hat darab  $4 \rightarrow 1$  intramolekuláris transz II hidrogénhiddal, ez található a valinomicin káliumkomplexének [36, 37] és a mezo analógjának szerkezetében [38, 39]. A második aszimmetrikus alkatú, öt darab  $4 \rightarrow 1$ , és egy  $5 \rightarrow 1$  intramolekuláris hidrogénhiddal. Ezt a formát találták az izoleucin analóg szerkezetében [33, 40]. A harmadik szimmetrikus ellipszoid vagy „fánk” alakú, négy darab  $4 \rightarrow 1$  és két  $5 \rightarrow 1$  hidrogénhiddal, ez a forma található a természetes valinomicinben is [29–31]. Végül ismeretes egy másik ellipszoid vagy „fánk” forma, négy  $4 \rightarrow 1$ , de csak egy  $5 \rightarrow 1$  hidrogénhiddal, ez a forma valósul meg a  $[\text{MeAla}^2]$  valinomicinben. Ez a négy forma lehetővé teszi, hogy elképzeljük a komplexképződés során végbemenő konformációváltozást [40].

### **Az enniation B közreműködésével a biomembránon keresztül haladó ion szállítás szerkezeti szempontjai**

Az enniatin B és analógjai szabad és fémkomplex formái szerkezetének elemzése [18–21, 25, 26, 41, 42] lehetővé teszi, hogy felvázoljuk a biológia hatásért felelős szerkezeti sajátosságokat. Ezek a molekulák fémionokat kötnek meg és részt vesznek az ionok biológiai membránon át történő áthaladásában. A biológiai hatás szempontjából fontos szerkezeti sajátosságok a következők:

1. Nagyfokú szimmetria;
2. Nincs intramolekuláris feszültség;
3. A karbonilcsoportok váltakozón le-fel irányulnak;
4. Mintegy 270 pm átmérőjű intramolekuláris poláris üreg;
5. Hidrofób külső felület, melyet az oldalcsoportok és az N-metil-csoportok hoznak létre, ez utóbbi a karbonil oxigénatomok által körülvelt hidrofób alsó részt képezi;
6. Az amid és észter csoportok síkjai egyidejűleg el tudnak fordulni, a nyíló és záródó „szírom” mechanizmusnak megfelelően.

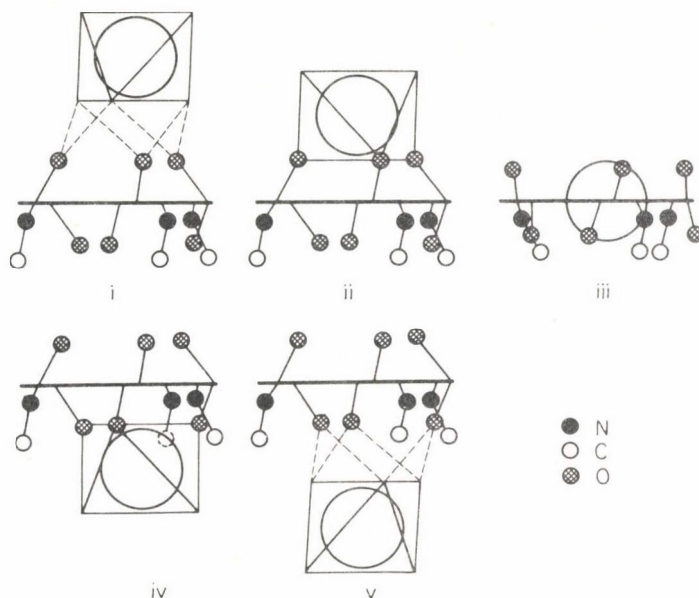
Az Enniation B molekulának számos fémionkötő aktív helye van. Ezek a következők: (I) a vízmolekulák által létrehozott, és az oxigénatomjaihoz hidrogénhidakkal kapcsolódó oktaéder középpontja; (II) három vízmolekula és ugyanazon oxigénatomok által létrehozott oktaéder középpontja; (III) a molekulaüreg középpontja; (IV)–(V) a molekula fősíkjához képest szimmetriával az első két ponthoz hozzárendelt helyek (15. ábra).

Meg kell jegyezni, hogy a (II)–(IV) alatt felsorolt helyeket vízmolekulák foglalhatják el, melyek tényleges mérete megközelíti a kálium ionét [18, 19, 25].

A kation transzport három fázisa a következő: a kation kötődése a membrán külső felületén; a membránon való áthaladás; a kation kibocsátása a membrán belső



felületén. A kötődési folyamat során a kation rendre az (I), (II) és (III) helyzetet foglalja el (15. ábra), a kibocsátás a (III), (IV) és (V) helyeken keresztül megy végbe. A kibocsátást a molekuláris csésze aljának kinyílása kíséri, azaz az *N*-metil csoportok eltolódnak a molekula tengelyétől. Három fémion transzport mechanizmust különböztethetünk meg: vivő, váltó és csatorna [43]. Mindhárom esetben a



15. ábra. Az enniatin B molekulában a kation kötődés aktív helyei

legfontosabb az, hogy enniatin B kation komplex poláris része a membrán belső lipofil részét leárnyékolja. A vivő és a váltó mechanizmus esetében felülről nincs kielégítő árnyékolás az antibiotikum-kation komplexben, ugyanakkor az *N*-metilcsoportok alulról kielégítően árnyékolnak. A legtökéletesebb árnyékolás a csatorna képződés során valósul meg. Ebben az esetben az enniatin B molekulák egymás fölött helyezkednek el a membránon való áthaladás közben.

Mivel a membrán vastagsága mintegy 5000 pm, 7–8 molekulából álló köteg elegendő a csatorna létrehozására. A molekula köteg kialakulása együttjár a molekuláris csészék aljának felnyílásával. Ezen folyamat során az *N*-metil csoportok a csatorna külső felületén helyezkednek el. Így a csatornát a hidrofób oldalcsoportok és az *N*-metilcsoportok kellőképpen befedik. A csatorna belső felülete viszont hidrofil. Ez kizárja a termodinamikailag kedvezőtlen kölcsönhatás lehetőségét az enniatin B molekula poláris része és a hidrofób környezet között. Ez jelentős mértékben stabilizálja a csatornát.



A csatorna képződés közben a szomszédos enniatin B molekulák karbonil oxigénatomjai olyan oktaédert hoznak létre, melyet a csatornán áthaladó fémion foglalhat el. Ez látható a 15. ábrán (II), ahol a vízmolekulákat más enniatin B molekulától származó karbonil oxigénatomok váltják fel. Más szóval, a kation transzport során a kation és az antibiotikum között egy szendvics-szerű komplex jön létre. Ez is stabilizálja a csatornát. Az enniatin B kálium ionokat tartalmazó oldatában három, sőt négy molekulából álló szendvics komplexeket találtak [44]. Meg kívánjuk jegyezni, hogy az enniatin B molekulák oldalirányú diffúziója következtében kialakuló csatornák a membránban dinamikus szerkezetüket illetően hasonlítanak az előbbihez: a foszforlipidek hidrofób láncainak oldalirányú diffúziója és hőmozgása következtében képződnek és esnek szét.

A csatorna átmérője közelítőleg megegyezik a káliumion nagyságával. Valószínűleg ezzel magyarázható az enniatin B molekula nagyfokú ionátvivő képessége. Nátriumion is képes áthaladni a csatornán, de az átmenet kevésbé hatékony, mert a csatorna átmérője lényegesen nagyobb, mint a nátriumioné. Ezért az enniatin B molekulával való kölcsönhatás gyengébb és a csatorna nem stabilis.

Meg kell jegyezni, hogy a fenti megfontolások alapján nem lehet a váltó és a vivő mechanizmust teljesen kizárni. Ezeknek a mechanizmusoknak szerepük lehet kisebb antibiotikum koncentráció vagy nagyobb kation esetében. Párhuzamosan is működhetnek a fő csatorna mechanizmussal. A váltó és a vivő mechanizmusok hatékonysága azonban kicsi.

### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönettel tartoznak J. A. OVCSINYIKOV akadémikusnak, V. T. IVANOV professzornak és Dr. A. V. EVSZTRATOVNAK, hogy a tanulmányozott mintákat a szerzők rendelkezésére bocsátották, értékes diskussziókkal és tanácsaikkal elősegítették a munka elvégzését.

### Összefoglalás

Az enniatin és a valinomycin sorba tartozó ionofor antibiotikumok és analógjaik (sztereoizomerek, polimerhomológok, amino és hidroxisavakban helyettesített származékaik) és ezek fémkomplexei kristályos állapotban észlelt konformációját elemezzük. Megtaláltuk azokat a térszerkezeti jellemzőket, melyek az enniatin B molekula biológiai hatásáért felelősek. Megvizsgáltuk az alkáli ionok biológiai membránon keresztül történő áthaladásának térszerkezeti szempontjait. Javaslatot teszünk az átvitel mechanizmusára.

### Summary

Crystal conformations of the molecules of ionophorous antibiotics of enniatin and valinomycin series as well as of their analogues (stereoisomers, polymer homologues, analogues with a change of some amino- or hydroxy-acid residues to other ones) and their complexes with metals are considered. Conformational features of enniatin B molecules responsible for its biological activity are found. Structural aspects of alkali metal ion transport across biological membranes are considered. A mechanism of that transport is suggested.

## IRODALOM

1. V. I. SMIRNOVA, L. N. ZEIBOT, N. E. ZHUKHLISTOVA, G. N. TISHCHENKO, V. I. ANDRIANOV, *Kristallografiya (USSR)* 21, 525 (1976).
2. N. E. ZHUKHLISTOVA, V. I. SMIRNOVA, G. N. TISHCHENKO, V. I. ANDRIANOV, *Kristallografiya (USSR)* 22, 77 (1977).
3. N. E. ZHUKHLISTOVA, G. N. TISHCHENKO, *Kristallografiya (USSR)* 25, 274 (1980).
4. V. I. SMIRNOVA, G. N. TISHCHENKO, *Kristallografiya (USSR)* 26, 109 (1981).
5. N. E. ZHUKHLISTOVA, G. N. TISHCHENKO, B. T. IBRAGIMOV, *Kristallografiya (USSR)* 26, 316 (1981).
6. G. N. TISHCHENKO, The Structure of the Linear and Cyclic Oligopeptides in Crystalline State, in: *Itogi Nauki, Kristallokhimiya*, ed. E. A. Gilinskaya, VINITI, Moskva (1978).
7. I. L. KARLE, X-ray Analysis: Conformation of Peptides in the Crystalline State, in: *The Peptide*, eds. E. Gross and T. Meienhofer, Acad. Press, New York, 1980.
8. E. BENEDETTI, R. E. MARSH, M. GOODMAN, *J. Amer. Chem. Soc.*, 98, 6676 (1976).
9. E. BENEDETTI, M. PALUMBO, G. M. BONORA, C. TONIOLO, *Macromolecules* 9, 417 (1976).
10. G. N. TISHCHENKO, Z. KARIMOV, N. V. NAZIMOVA, *Bioorgan. Khimiya (USSR)* 1, 375 (1975).
11. G. N. TISHCHENKO, Z. KARIMOV, V. V. BORISOV, *Bioorgan. Khimiya (USSR)* 1, 378 (1975).
12. G. N. TISHCHENKO, N. V. NAZIMOVA, V. I. ANDRIANOV, Z. KARIMOV, *Bioorg. Khimiya (USSR)* 1, 386 (1975).
13. V. I. SMIRNOVA, L. N. ZEIBOT, N. V. NAZIMOVA, G. N. TISHCHENKO, V. I. ANDRIANOV, *Bioorgan. Khimiya (USSR)* 2, 885 (1976).
14. Z. KARIMOV, G. N. TISHCHENKO, *Kristallografiya (USSR)* 24, 778 (1979).
15. A. I. KARAULOV, G. N. TISHCHENKO, B. K. VAINSHTEIN, *Cryst. Struct. Commun.*, 9, 593 (1980).
16. Z. KARIMOV, A. M. MIKHAILOV, G. N. TISHCHENKO, *Bioorgan. Khimiya (USSR)* 2, 1446 (1976).
17. V. Z. PLETNEV, E. M. POPOV, *Biofizika (USSR)* 16, 407 (1971).
18. G. N. TISHCHENKO, Z. KARIMOV, B. K. VAINSHTEIN, A. V. EVSTRATOV, V. T. IVANOV, YU. A. OVCHINNIKOV, *FEBS Letters*, 65, 315 (1976).
19. G. N. TISHCHENKO, A. I. KARAULOV, Z. KARIMOV, *Kristallografiya (USSR)* 26, 984 (1981).
20. N. E. ZHUKHLISTOVA, G. N. TISHCHENKO, *Kristallografiya (USSR)* 26, 1232 (1981).
21. N. E. ZHUKHLISTOVA, G. N. TISHCHENKO, *Kristallografiya (USSR)* in press.
22. G. N. TISHCHENKO, Z. KARIMOV, V. I. ANDRIANOV, B. K. VAINSHTEIN, A. V. EVSTRATOV, V. T. IVANOV, YU. A. OVCHINNIKOV, *Bioorgan. Khimiya (USSR)* 3, 467 (1977).
23. G. N. TISHCHENKO, Z. KARIMOV, *Kristallografiya (USSR)* 23, 729 (1978).
24. YU. A. OVCHINNIKOV, V. T. IVANOV, A. M. SHKROB, *Membrane-Active Complexes*, Nauka, Moskva (1974).
25. A. J. GEDDES, D. AKRIGG, *Acta Crystallogr.*, B32, 3164 (1976).
26. M. DOBLER, J. D. DUNITZ, J. KRAJEWSKI, *J. Mol. Biol.*, 42, 603 (1969).
27. V. Z. PLETNEV, E. M. POPOV, *Bioorgan. Khimiya (USSR)* 1, 160 (1975).
28. A. I. KARAULOV, G. N. TISHCHENKO, *Cryst. Struct. Commun.*, közlés alatt.
29. W. L. DUAX, H. HAUPTMAN, *Acta Crystallogr.*, B28, 2912 (1972).
30. G. D. SMITH, W. L. DUAX, D. A. LANGS, G. T. DETTITTA, J. W. EDMONDS, D. C. ROHRER, C. M. WEEKS, *J. Amer. Chem. Soc.*, 97, 7242 (1975).
31. I. L. KARLE, *J. Amer. Chem. Soc.*, 97, 4379 (1975).
32. K. TITLESTAD, P. GROTH, J. DALE, M. Y. ALI, *Chem. Commun.*, 346 (1973).
33. W. L. DUAX, G. D. SMITH, C. M. WEEKS, V. Z. PLETNEV, N. M. GALITSKY, V. T. IVANOV, YU. A. OVCHINNIKOV, XI Intern. Congr. of Crystallography, Warszawa, Poland, Coll. Abstr., p. 74 (1978).
34. V. Z. PLETNEV, N. M. GALITSKY, V. T. IVANOV, D. A. LANGS, W. L. DUAX, *Bioorgan. Khimiya (USSR)* 6, 5 (1980).
35. V. I. SMIRNOVA, G. N. TISHCHENKO, B. K. VAINSHTEIN, *Doklady Akad. Nauk SSSR*, 257, 879 (1981).
36. M. PINKERTON, L. K. STEINRAUF, P. DAWKINS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 512 (1969).
37. K. NEUPERT-LAVES, M. DOBLER, *Helv. chim. acta*, 58, 432 (1975).
38. V. Z. PLETNEV, N. M. GALITSKY, V. T. IVANOV, YU. A. OVCHINNIKOV, *Bioorgan. Khimiya (USSR)* 3, 1427 (1977).
39. A. D. VASILYEV, T. A. SHIBANOVA, V. I. ANDRIANOV, V. I. SIMONOV, A. A. SANASARYAN, V. T. IVANOV, YU. A. OVCHINNIKOV, *Bioorgan. Khimiya (USSR)* 4, 1157 (1978).

40. G. D. SMITH, W. L. DUAX, in: *Metal-Ligand Interactions in Organic Chemistry*, part I, eds. B. Pullman and N. Goldblum, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht; Holland, pp. 291—315 (1977).
41. J. U. HAMILTON, L. K. STEINRAUF, B. BRADEN, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 151 (1975).
42. B. K. VAINSHTAIN, G. N. TISHCHENKO, V. I. SIMONOV, N. E. ZHUKHLISTOVA, A. I. KARAULOV, V. European Crystallogr. Meeting, Copenhagen, Denmark, Coll. Abstr. p. 50 (1979).
43. A. A. LEV, *Modelling of Ionic Selectivity of Cell Membranes*, Nauka, Leningrad, pp. 140—184 (1976).
44. YU. A. OVCHINNIKOV, V. T. IVANOV, A. V. EVSTRATOV, I. I. MIKHALEVA, V. E. MESHCHERYAKOVA, V. M. TULCHINSKY, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **6**, 465 (1974).



## DIHIDROERGOPEPTINEK KONFORMÁCIÓJA KRISTÁLYBAN ÉS OLDATBAN

H. P. WEBER, H. R. LOOSLI, T. J. PETCHER

(Sandoz Ltd., Pharmaceutical Division, Preclinical Research, 4002 Basel, Svájc)

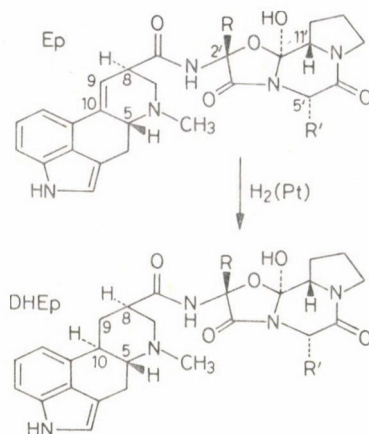
### Bevezetés

Az ergopeptinek (Ep) abba a terápiásan fontos vegyületcsaládba tartoznak [1], mely a természetes alkaloidokat és (fél)-szintetikus származékaikat foglalja magába. Mindegyiknek két részből álló közös alapszerkezetük van: (I) a *lizersav fragments* és (II) a *ciklikus tripeptid rész*, melyeket a *központi amid* rész kapcsol össze (l. 1. ábra). A természetes ergot alkaloidokban a C(2') és C(5') helyeken különböző szubsztituenseket találunk, így például az ergotaminban, a migrén elleni potenciális gyógyszerben a C(2') atomnál metilcsoport, a C(5') atomnál benzilcsoport van. A 9,10-kettős kötés katalikus hidrogénezésével a *dihidroergopeptinekhez* (DHEP) jutunk, melyek terápiás szempontból szintén érdekesek. A reakció sztereospecifikus és csak 10<sub>x</sub>- (vagy 9,10-*transz*)-DHEp-k keletkeznek.

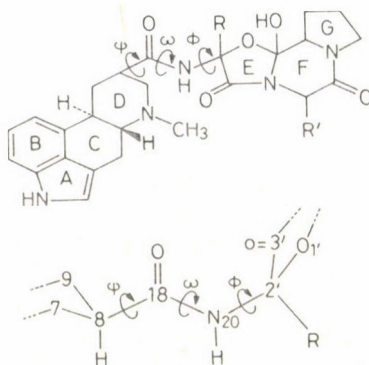
### A DHEp-k konformáció analízise

A DHEp két policiklusos alkotórésze meglehetősen merev (l. 2. ábrát), mint ahogy az az egyszerű modell építésből is kiderül: a lizersav benz[c,d]indol része (az A, B és C gyűrűk) sikrendszert képez, melyből csak a C5 atom nyúlik 40 pm-rel a gyűrű fölé. A C/D *transz* kapcsolatú D gyűrű kedvezményezett konformációja szék, de a kád konformációt sem lehet teljesen kizárni. A röntgenszerkezet vizsgálat és az NMR spektroszkópia kísérleti eredményei megerősítették, hogy a D gyűrű valóban szék (l. később). A triciklusos peptid rész a síkalkatú E-gyűrűből és a boríték alkatú F gyűrűből áll (C 11' a boríték nyelve). A prolin G gyűrű korlátozott mozgékonyaságú (pszeudorotációjú), a kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a kedvezményezett konformáció olyan borítékforma, melynél a C(10') atom a nyelvé.

A molekula konformációját alapvetően a központi amid három torziós szöge:  $\Psi$ ,  $\omega$  és  $\varphi$  (l. 2. ábrát) határozza meg. A  $\Psi$  és  $\varphi$  szögek elméletileg 0 és  $2\pi$  között változnak, míg  $\omega$  szög a CO—NH kötés részleges kettőskötés jellege miatt 0 és  $\pi$  körüli értékre korlátozódik. A dihidroergotamin (DHE) konformációjáról néhány előzetes eredményt kaptunk a CAMSEQ II szabad tér empirikus erőter program segítségével [2], a számítás során  $\Psi$  és a  $\varphi$  szögeket változtattuk szisztematikusan, az  $\omega$  szöget a



1. ábra. Az Ergopeptinek (Ep) és Dihydroergopeptinek (DHEp) szerkezeti képletei



2. ábra. A DHEp konformációját meghatározó tényezők. A beábrnyékozott gyűrűs rendszer meglehetősen merev, a  $\psi$ ,  $\omega$  és  $\varphi$  torziós szögekkel jellemzett központi amid határozza meg alapvetően a molekula téralkatát

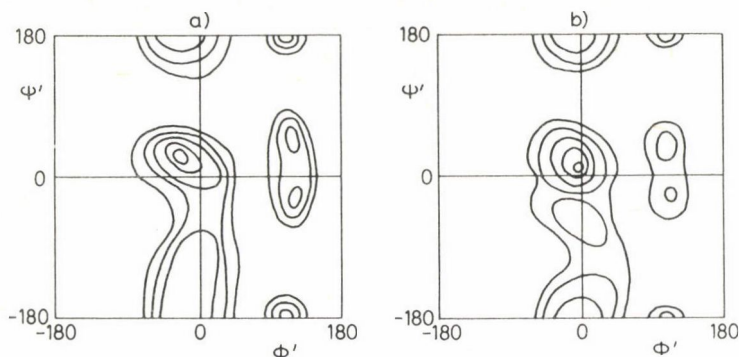
transz amidnak megfelelő  $180^\circ$ -os értéknél tartottuk. Az eredményeket a 3. ábra szemlélteti. A következő típusú kölcsönhatásokat vettük figyelembe:

(1) Térbeli (Lennard—Jones potenciál):

$$E_{st} = \sum_{i < j} \left( -\frac{A_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} \right)$$

(2) Elektrosztatikus (Coulomb potenciál, a töltések a Del Re módszer szerint):

$$E_{el} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$



3. ábra. (a) DHE konformációs energia térképe a  $\varphi'$  és  $\psi'$  szögek függvényében. ( $\psi'$  a C(8)—C(18) kötés körüli,  $\varphi'$  pedig az N(20)—C(2') körüli elfordulás, a kiinduló téralkat a kristályos állapotban talált, azaz  $\psi' = 0$ ,  $\varphi' = 0^\circ$ . Az energia számításban csak térbeli kölcsönhatásokat veszünk figyelembe. A szintvonalakat a fő minimumtól kiindulva 8,2 kJ/mol egységenként rajzoltuk be. (b) Ugyanaz mint (a), de térbeli elektrosztatikus, hidrogénhid, és torziós kölcsönhatásokat is figyelembe vettünk az energia számolásnál

(3) Hidrogén kötés (kombinált térbeli-elektrosztatikus potenciál,  $f(\varphi)$  geometriai javító tényezővel):

$$E_{\text{Hb}} = \left\{ -\frac{A_{\text{HA}}}{[r_{\text{HA}} + (\varphi)]^6} + \frac{B_{\text{HA}}}{[r_{\text{HA}} + f(\varphi)]^{12}} - \frac{q_{\text{A}}q_{\text{H}}}{r_{\text{HA}}} \right\} E_0$$

(A = akceptor atom, H = hidrogén atom,  $\varphi = \angle(\text{D—H} \dots \text{A})$ ,  $r_{\text{HA}} = \text{H} \dots \text{A}$ )

(4) torziós:

$$E_{\text{tor}} = A B + C \cos^n(m\tau - \delta)$$

Az összes paramétert a CAMSEQ II programból vettük [2]. Figyelemre méltó, hogy a legalacsonyabb energiájú téralkat, mely mind a négy kölcsönhatás figyelembe vételével számoltunk (l. 3b ábra) nagyon közel áll a kristályos állapotban talált konformációhoz ( $\psi' = \varphi' = 0$ ), ugyanakkor a fő tényező,  $E_{\text{st}}$  alapján számított minimális energiájú téralkatnál  $\varphi' = -25^\circ$ ,  $\psi' = 25^\circ$ . A minimális energiájú konformer (3b ábra, összes kölcsönhatás figyelembe vétele) egy 41 kJoule/mol-nál mélyebb potenciál gödörben van, más kis energiájú konformerekbe való átmenetet a viszonylag magas energiát akadályozza meg.

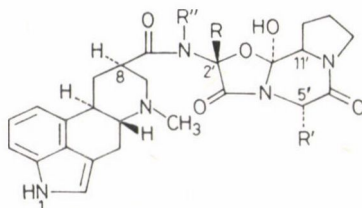
### Kísérleti rész

A DHEp szerkezetek bonyolultsága miatt szilárd kísérleti alapra volt szükség ahhoz, hogy elméleti számításokat végezhesünk. Ezért a DHEp-ék téralkatát röntgendiffrakciós és NMR módszerekkel vizsgáltuk. A hat vizsgált vegyületet az 1. táblázat tartalmazza.



1. táblázat

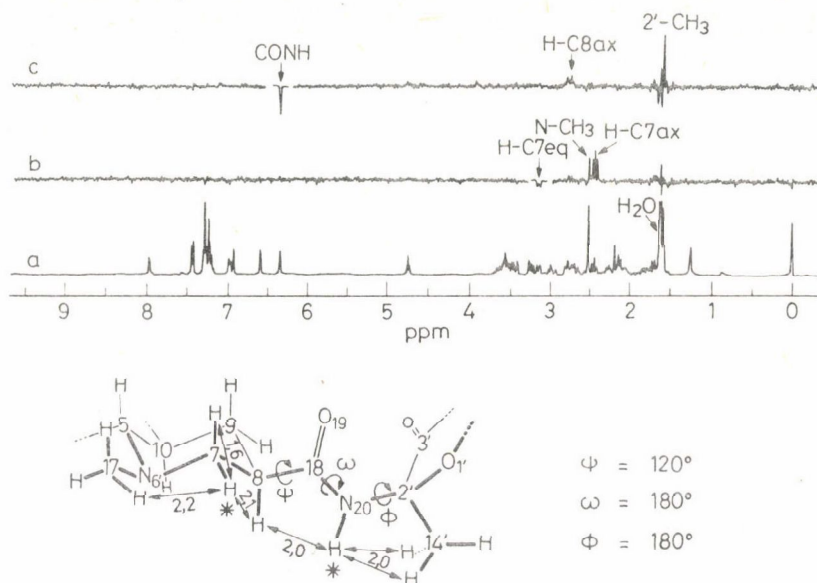
Az NMR spektroszkópiával és röntgendiffrakciós analízissel vizsgált DHEp-k



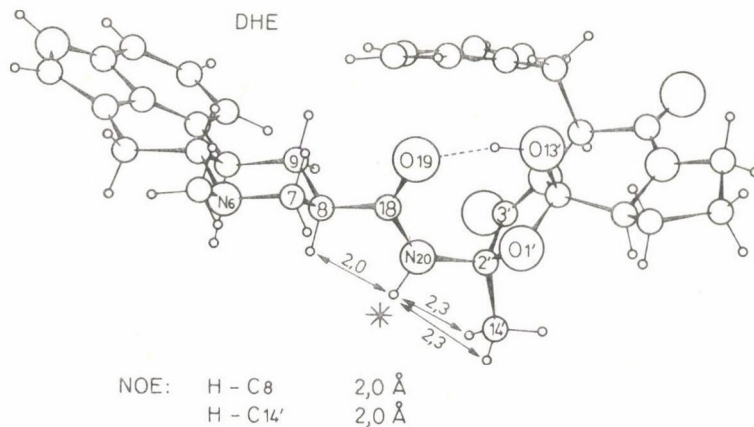
	R	R'	R''
1. DHE	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> Ph	—H
2. 2-Aza-DHE	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> Ph	—H
3. 5'-epi-DHE	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> PH(α)	—H
4. 1,11'-Dime-DHEc	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—H
5. 8-iso-DHE	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> Ph	—H
6. 37—190	—CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—CH <sub>3</sub>

Itt nem célunk, hogy a krisztallográfiai eredményeket részleteiben tárgyaljuk, de röviden érintjük azt az NMR technikát, melynek segítségével az oldatbeli konformációt tanulmányoztuk.

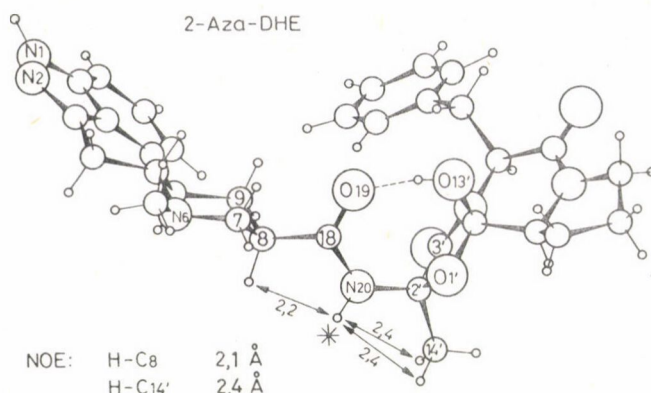
A Nukleáris Overhauser Effektus (NOE) elvben alkalmas H...H távolságok meghatározására, mivel a hatás nagysága  $R_{H...H}^{-6}$ -val arányos. Az  $R_{H...H}$  távolság növelésével a NOE gyorsan csökken, a gyakorlatban csak a legrövidebb H...H távolságokat, a 300 pm-nél kisebbeket lehet meghatározni. A különbségi NOE módszert a dihidroergotamin (DHE) példáján mutatjuk röviden be. A 4a ábrán a perturbálatlan (normális) <sup>1</sup>H—NMR-spektrum látható. A 4b és 4c ábrákon olyan spektrumokat láthatunk, melyeket úgy kaptunk, hogy a perturbált (NOE) spektrumból kivontuk a normál spektrumot, így pl. a 4b spektrum egy olyan különbségi NOE spektrum, melyet a H—C(7eq) atomon történt besugárzással, a 4c spektrum esetében pedig az amid protonon történt besugárzással kaptunk. A különbségi NOE spektrumok jól mutatják melyik protonokat érintett a hatás, pl. a 4b spektrumnál a geminális H—C(7ax) protonon és az N(6)-metil protonokon figyelhető meg erős NOE; a 4c spektrumnál a H—C(8ax) és a C(2')-metil protonokat egyformán érinti az effektus. Az ekvatoriális és axiális C(7) protonok közötti NOE nagyságrendjét (4b ábra) használtuk belső összehasonlítóként ( $H_{eq} \dots H_{ax} = 165$  pm) a többi H...H távolság kalibrálása céljából. A D-gyűrű szék konformációja egyértelműen következik a C(7)-, C(8)-, C(9)-protonok NMR kapcsolódási állandójából. A NOE-ből kapott H...H távolságokból kiindulva molekula modelleken (pl. Dreiding modelleken) megmutatható, hogy az egyetlen lehetséges konformáció az, melyet a 4. ábra alsó részén mutatunk be, és amelyik megegyezik a DHE kristályos állapotban kapott téralkatával. Az 5—10 ábrákon a röntgendiffrakciós és NMR—NOE eredményeket foglaltuk össze



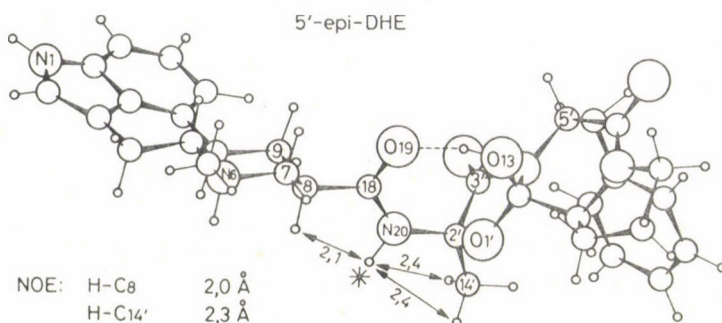
4. ábra. A DHE különbségi NOE spektrumai (a) spektrum: normális (perturbálatlan)  $^1\text{H}$ -NMR, (b) spektrum: D-NOE a  $\text{H}-\text{C}(7\text{eq})$  besugárzott(c) spektrum: D-NOE a CONH csoportban besugárzott. Alsó rész: A NOE kísérletekből meghatározott  $\text{H}\cdots\text{H}$  távolságokkal összhangban levő konformáció



5. ábra. A DHE-re nyert röntgendiffrakciós és NOE eredmények. A kristályszerkezetben levő molekula szerkezetet a központi amid legjobb síkjában fekvő vetületen mutatjuk be. Felhívjuk a figyelmet a  $\text{H}-\text{C}(8)-\text{C}(18)-\text{O}$  és a  $\text{C}(18)-\text{N}(20)-\text{C}(2')-\text{C}(14')$  csoportok *transz* helyzetére, és az  $\text{O}(13')-\text{H}\cdots\text{O}(19)$  intramolekuláris hidrogénhídra. Néhány  $\text{H}\cdots\text{H}$  távolságot, melyek fontosak a központi amid konfigurációja szempontjából, a kristályszerkezetben számszerűen megadtunk. Az NMR-NOE kísérlettel meghatározott  $\text{H}\cdots\text{H}$  távolságokat az ábra alsó részén tüntettük fel, a besugárzás a CONH csoport hidrogénatomján történt, ezt csillaggal jelöljük. A  $\text{H}\cdots\text{H}$  távolságok jól egyeznek a kristályszerkezetben levőkkel



6. ábra. A 2-aza-DHE-re kapott röntgendiffrakciós és NOE eredmények. Figyelemre méltó a DHE-vel való hasonlóság (5. ábra)



7. ábra. Az 5'-epi-DHE röntgendiffrakciós és NOE eredményei. Hasonlítsd össze 5. és 6. ábrákkal

a vizsgált hat vegyületre. Az utolsó 37—190 jelzésű vegyület kivételével az összes vegyület konformációja megegyezik a kristályban és oldatban.

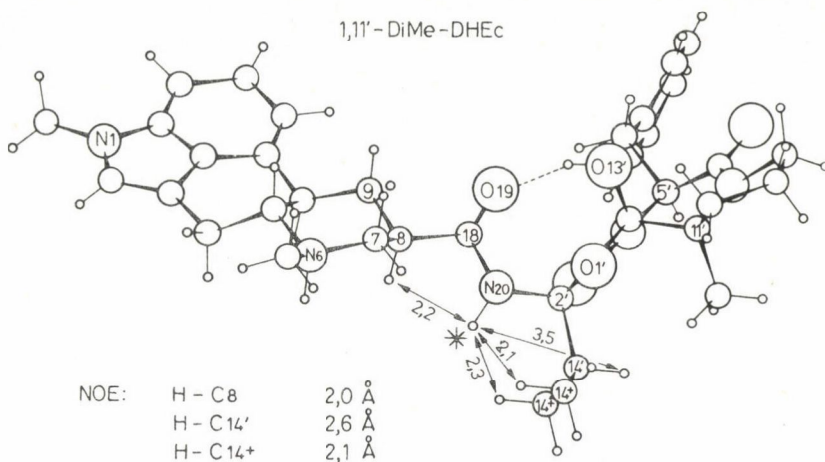
A 37—190 vegyület esetében, mely metilezett amid, a NOE kísérletek azt mutatják, hogy oldatban a  $\varphi$ -szög kb. 30 fokkal eltér a kristályos állapotban észlelthez képest, de a *transz*-amid és a  $\psi$ -konfiguráció jól egyezik.

A DHEp-kről összefoglalásképpen a következőket mondhatjuk:

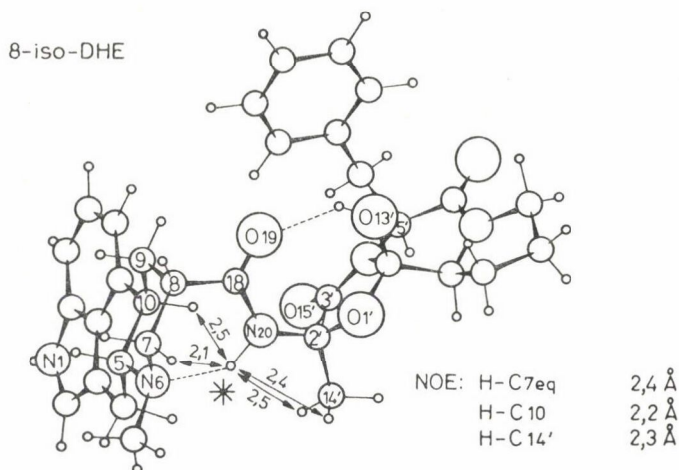
(1) A kristályos konformáció (röntgendiffrakció) igen hasonlít  $\text{CDCl}_3$  oldatban találthoz (NMR, NOE).

(2) A tipikus DHEp konformációt az jellemzi, hogy a D-gyűrű szék alkatú, a központi amid rész *transz*, a  $\psi(\text{H}-\text{C}(8)-\text{CO}-\text{NH})$  és a  $\varphi(\text{CO}-\text{NH}-\text{C}(2')-\text{R})$  torziós szögek közel  $180^\circ$  értékűek;  $\text{CO}(18)\dots\text{H}-\text{O}(12')$  intramolekuláris hidrogénhid van jelen.





8. ábra. Az 1,11'-diMe-DHEc-re kapott röntgen és NOE eredmények. Vesd össze az 5. és 7. ábrákkal. A fő szerkezeti jellemzők változatlanok, azaz a H—C(8)—C(18)—N(20) és H—N(20)—C(2')—C(14') csoportok téralkata az amid csoport *transz* jellege és az O(13')—H—O(19) intramolekuláris hidrogénhid. A kristályszerkezetben a C(2')-izopropil csoport nyitott téralkatú úgy, hogy a H—C(14') az N(20)-hoz képest *transz* helyzetű. Fel kell tételeznünk, hogy oldatban az izopropil csoport forog a C(2')—C(14') kötés körül, ennek következtében a H—C(14') csoport 2/3 időben *gauche* helyzetű. Ha ez a forgás az NMR időskálán gyors, a NOE kísérletnek a H—C(14'), H—N(20) távolság átlagát kell adnia, ami kb. 260 pm. Az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a kristályos állapotban és az oldatban levő konformációk megegyeznek

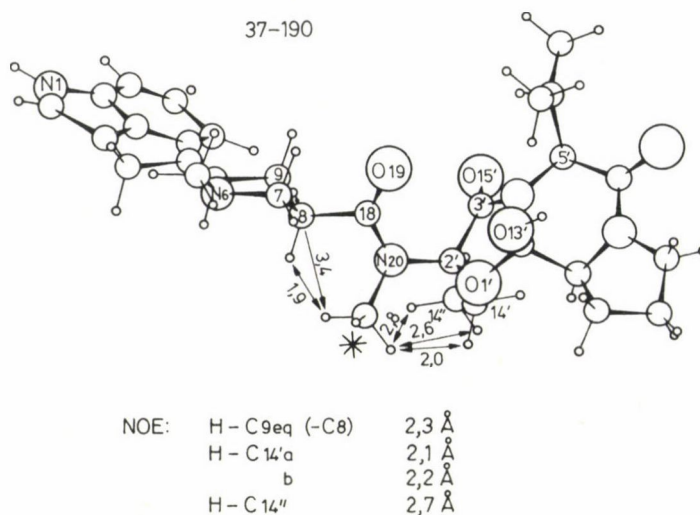


9. ábra. A 8-iso-DHE röntgen és NOE eredményei. A vetítés iránya ugyanaz mint az 5. és 8. ábrák esetében, azaz a központi amid átlag síkja fekszik a rajz síkjában. Felhívjuk a figyelmet, hogy a C(8) atomhoz kapcsolódó amid csoport a *D*-gyűrűhöz képest axiális. A C(18)—N(20)—C(2')—C(14') csoport *transz* helyzete, és az intramolekuláris hidrogénhid megmaradt a szerkezetben, mint a DHE, 2-aza-DHE, 5'-epi-DHE és 1,11'-dime-DHEc vegyületek szerkezetében (l. 5—8. ábrákat). Ugyanakkor az amid csoport axiális helyzete további N(20)—H...N(6) intramolekuláris hidrogénhid kialakulását teszi lehetővé, ennek következtében viszont a H—C(8)C(18)—N(20) csoport *gauche* ( $\varphi = 100^\circ$ ) helyzetű lesz. Az NMR—NOE eredmények jól egyeznek a kristályszerkezettel

(3) A kedvező szék konformációja a D-gyűrűnek a 8-*izo*-DHE-ben is megmarad, ahol a központi amid axiális helyzetet foglal el, úgy hogy egy második *intramolekuláris* N(6) . . . HN (amid) hidrogénhid is kialakulhat.

(4) Az észlelt DHEp konformációk a tájékoztató konformáció analízisek szerint stabilisak.

További — elsősorban elméleti — munkára van szükség abból a célból, hogy a jellemző konformáció stabilitását részletesebben megismerjük és megvizsgáljuk más konformációba való átmenetek lehetőségét.



10. ábra. A 37–190 molekula röntgendiffrakciós és NOE eredménye. A H—C(8)—C(18)—N(20) csoport itt is *transz* konfigurációjú, mint ahogy azt a többi négy DHEp-ben megfigyeltük (l. 5–8. ábrák). Az N(20)-metil és a C(2')-etil csoportok közötti térbeli tasztítás következtében azonban az N(20)—C(2') kötés ( $\varphi$  szög) körüli kb. 30°-os elfordulást tapasztalunk, és ugyanakkor az O(13')—H . . . O(19) *intramolekuláris* hidrogénkötés felszakad. A NOE eredmények nem egyeznek meg teljesen a röntgen szerkezettel, azaz az N(20)-metil protonok és a H—C(9<sub>eq</sub>) közötti rövid H . . . H távolságot nem tapasztaltuk a kristályrácsban. (A D—NOE spektrum értelmezése azonban nehézségekbe ütközött, mivel a H—C(8) jel egybeesik az amid metilproton jelével, és ezért egy tiszta, a metilcsoporton kiváltott NOE nem volt lehetséges)

### Összefoglalás

Hat dihidro-ergopeptin molekuláris konformációját vizsgáltuk röntgendiffrakcióval és NMR spektroszkópiával. Az összehasonlító tanulmányok szerint a dihidro-ergopeptinek molekuláris konformációja kristályos állapotban és híg oldatban ( $10^{-3}$  M CDCl<sub>3</sub>-ban) igen hasonló. A konformáció analízis arra mutat, hogy a talált konformáció stabilis.

### Summary

The molecular conformations of six dihydro-ergopeptines have been investigated by X-ray analysis and NMR spectroscopy. The comparative study showed that the molecular conformations of dihydro-ergopeptines in the crystalline state and in dilute solution ( $10^{-3}$  M in  $\text{CDCl}_3$ ) are very similar. Conformational analysis indicates that the observed conformations may be well stabilised.

### IRODALOM

1. B. BERDE, H. O. SCHILD, kiadók „Ergot Alkaloids and Related Compounds” a „Handbook of Experimental Pharmacology 49. kötete, Springer-Verlag, Berlin (1978).
2. R. POTENZONE, E. CAVICHI, H. J. R. WEINTRAUB, A. J. HOPFINGER, Computers and Chemistry, *1*, 187 (1977).



## FARMAKOLÓGIAI HATÁSÚ MOLEKULÁK NEM-EGYENSÚLYI KONFORMÁCIÓINAK JELENTŐSÉGE

W. GRAHAM RICHARDS

(Physical Chemistry Laboratory, Oxford University, Anglia)

### Bevezetés

A „zár és kulcs” modell jó néhány évtizedig szolgált a kis, biológiailag aktív molekulák és receptoraik kölcsönhatásának leírására Ehrlich idejétől kezdve. Ezt később az egzaktabb „kéz és kesztyű” analógiával cserélték fel [1].

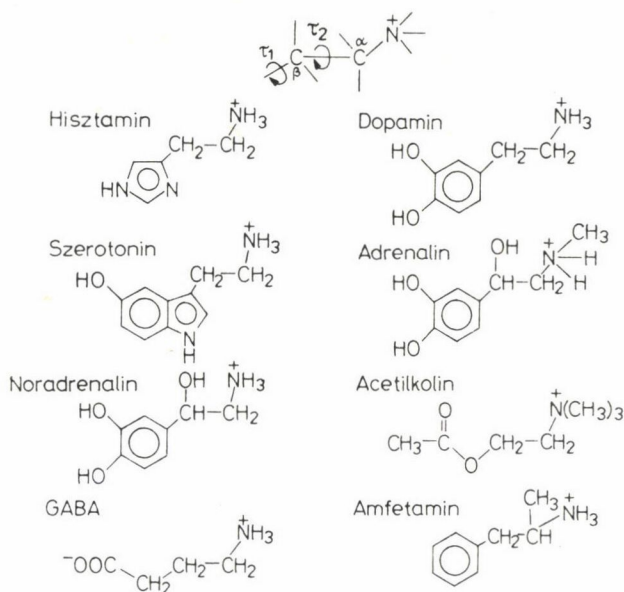
Az újabb modell magában foglalja a makromolekula receptor és a kis molekula bensőséges illeszkedését, továbbá mindkét partner flexibilitásának lehetőségét is. Sok bizonyíték van [2] a fehérjék konformációváltozására, amikor kis molekulák kötődnek specifikus helyekre. Enzim szubsztrátok gyakran olyan konformációban kötődnek, melyek különböznek a szabad, nem kötött állapottól. A kis partner konformációváltozása a kötődéskor különösen valószínű a neurotranszmitterek esetében és néhány meggyőző bizonyíték létezik arra, hogy valójában ez történik.

Néhány ismert és posztulált neurotransmitter szerkezetét az 1. ábrán összegezzük.

A nyilvánvaló hasonlóság a bemutatott molekulákon az, hogy két meglehetősen flexibilis torziós szögük van, ami lehetővé teszi, hogy ezeket a szögeket variálva széles tartományban változtassuk konformációjukat. A kis neurotranszmitterek egy másik közös tulajdonsága, hogy több, farmakológiailag eltérő receptort is igénybe tudnak venni.

Az acetilkolin hatást fejt ki a vázizom neuromuszkuláris csatlakozására és az autonóm idegrendszer paraszimpatikus és szimpatikus idegeinek ganglionjaira, melyeket nikotin is stimulál, kurare alkaloidok blokkolnak, de az atropin nem. A simaizmok paraszimpatikus, acetilkolin által közvetett hatása muszkarinnal kiváltható és gátolható atropinnal, de kurare alkaloidokkal nem. Vannak *nikotin* és *muszkarin* receptorok.

Az adrenerg hatásokat hasonlóan különböző receptorok közvetítik, első megkülönböztetés szerint  $\alpha$  és  $\beta$ , de újabban további kategóriákra osztották fel, úgymint  $\beta_1$  és  $\beta_2$ . A különböző receptorokat a különböző agonistákkal szemben mutatott érzékenység alapján osztályozzák. A dopaminnál ugyanez az eset. A D1-gyel jelzett receptorhelyek az adenil-ciklázhoz kapcsolódnak [3—5]. A D2 jelű dopamin-receptoroknak nincs köze az adenil-cikláz stimulációjához, de például részt vesznek a



1. ábra. Néhány posztulált neurotransmitter a változtatható torziós szögek feltüntetésével

prolaktin kibocsátás indukált dopamin gátlásában. Továbbá nagy különbség van néhány agonista és antagonistá hatásosságában [6].

A GABA ( $\gamma$ -aminovajsav) az agyban legalább két különböző receptorhoz kötődik, melyek közül az egyik megköti benzodiazepineket is, de a másik nem [7].

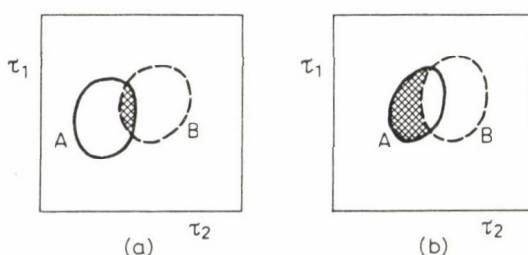
A hisztamin két megkülönböztethető receptora [8], H1 és H2, megint csak az antagonisták segítségével definiálható, melyek szelektíven blokkolják a megfelelő preparátum választ a hisztamin stimulációra.

Ezekben a példákban sok magyarázat lehet arra, hogy miért használ a természet egyes kis molekulákat arra a célra, hogy ionosan megkülönböztethető receptorhelyekhez kössön. Különböző formáknak vagy ugyanannak a molekulának különböző oldalainak hasznosítása szolgálhat lehetőségként. Még valószínűbbnek látszik, hogy a rugalmas ligandum különböző konformereinek van jelentősége. Nem szükségszerű, hogy ezek a konformerek stabilak legyenek, az egyedüli előfeltétel az, hogy a megkívánt alak ne legyen energetikailag nagyon messze az energiefelület minimumától. Ez az a lehetőség, ami minket az elméleti módszerek használatához vezet. Ha a megkövetelt alak nem egyensúlyi konformáció, akkor sem a röntgendiffrakció, sem az NMR nem alkalmas annak vizsgálatára.

Számítások, lévén egyaránt használhatók stabil és instabil formák kezelésére, lehetővé teszik, hogy megválasszunk a kérdést: „van-e a neurotranszmittereknek valamilyen speciális konformációja, mely lényeges egy adott receptorhoz történő kötődéshez?”

### Stratégia

Fő vonalakban az eljárás, ahogy az egyedi receptoroknak megfelelő lényeges konformációkra vonatkozó kérdéseket megválaszoljuk, a következő. Ki kell számítani a molekulának lehetséges alakjait és összehasonlítani azokat az aktív agonisták lehetséges konformációival, hogy hipotézist állíthassunk fel azon alakokról, melyek az aktivitás előfeltételei. Ezeket a hipotéziseket további molekulák esetén kipróbálhatjuk és elvethetjük, vagy tovább finomíthatjuk. Röviden a stratégia a konformációra vonatkozó Venn-diagrammok felállítása, mely a reaktivitáshoz szükséges, de nem elégséges feltételhez vezet el (2. ábra).



2. ábra. Venn diagrammok, melyek az aktivitáshoz szükséges, de nem elégséges feltételeket mutatják (vonalkázott). (a) A és B molekulák, mindkettő aktív. (b) A aktív B inaktív molekula

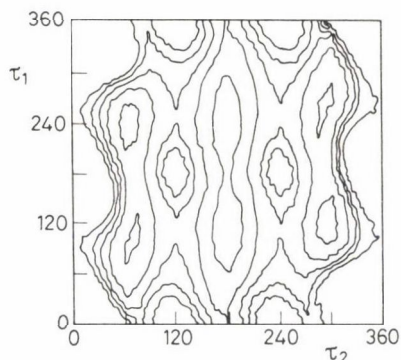
Az eljárás első lépése az, hogy egy potenciális energia-felületet nyerjünk; a molekula belső energiája, mint két torziós szög függvényében. Ezután meg lehet kezdeni a közelítő számításokat és választani kell a rivális elméleti módszerek közül. Majdnem általánosan elfogadott, hogy a kötéshosszak és kötésszögek által meghatározott geometria krisztallográfiai mérésekből származik. A potenciális energia-felületek kvantummechanikai számításainak nagy többségében csak a torziós szögeket variálják. A tisztán empirikus molekula-mechanikai módszerek csökkenthetik a feszültséget. Az összes módszer, kezdve a teljes empirikustól a nagyon parametrizált szemiempirikus kvantummechanikai közelítő módszereken keresztül az *ab initio* módszerekig, beleértve a konfigurációs kölcsönhatást is, többé-kevésbé közelítő. Látszólagosan minden számítás egyedüli, izolált molekulára vonatkozik.

Ezen okokból mindig fontos, hogy a kapott potenciál-felületet összhangba hozzuk a röntgendiffrakció és NMR kísérleti eredményekkel. Ideális esetben a röntgendiffrakció egy vagy talán több pontot szolgáltat a potenciál-felületen; az NMR részleteket szolgáltat elegendően mély területekről, melyek kellő populációval rendelkeznek, míg a számítás a teljes felületet szolgáltatja.

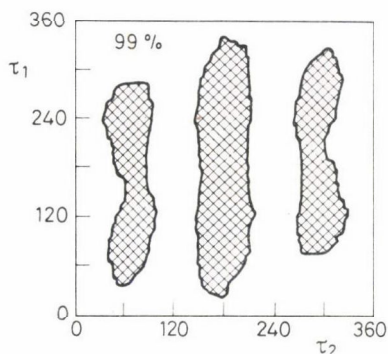
Az elméleti vizsgálatok másik fő komplikációja az oldószer, vagy még realiztikusabban és még nehezebben mérhetően, a molekulák biológiai környezetének a hatásának a figyelembevétele. Valamit tehetünk a tiszta víznek a konformációs



szabadenergiára gyakorolt befolyásának figyelembevételével. Semmit sem tudunk azonban a receptor környezetének részleteiről. Emiatt a tanulmányozott agonista molekuláknak kémiai és fizikailag a lehető leghasonlóbbaknak kell lenni, hogy megtehesük azt az egyszerűsítést, miszerint a környezet hatása, bár nem ismeretes, de konstans tényezőként jelentkezik.



3. ábra. A hisztamin monokation potenciális energiafelülete



4. ábra. A hisztamin monokation százalékos térképe. A vonalkázott terület a molekulák 99%-át zárja be 37 °C-on

Ezeket a nehézségeket szem előtt tartva, ha egy számítási módszert kiválasztottunk az ismert tényekkel való összhang alapján, a potenciális energiát kontúrképek formájában ábrázolhatjuk (3. ábra).

Az energiatérkép sok információt tartalmaz, de nem alkalmas arra, hogy Venn-diagrammban alkalmazzuk. Egy egyszerűsített változat szükséges, mely csak egy választ ad arra, hogy milyen alak tartomány lehetséges a molekulában. A legegyszerűbben úgy érhetjük ezt el, hogy valamilyen önkényes kontúrt veszünk a felületen a globális minimum fölött. Ennek a megoldásnak az a hiányossága, hogy nem veszi figyelembe a felület alakját. Széles és sekély minimumok nagyobb molekula populációt

fognak tartalmazni, mint mély és szűk lyukak: más szavakkal az entrópia effektusok jelentősek és inkább szabadenergia információra van szükségünk, mint belső energiára. Ezt úgy érhetjük el [9], hogy Boltzmann faktorokat használunk és a diagrammokat egy kontúrral ábrázoljuk, mely mondjuk a molekulák 99%-át foglalja magában fiziológiás hőmérsékleten. A 4. ábrán egy példát mutatunk be, melyen az árnyékolt terület első pillantásra jelzi a molekula flexibilitásának mértékét.

### Példák

#### Hisztamin

Egy régi példa, mely kiállta az idők, valamint számos új vegyülettel végzett vizsgálat próbáját, az, hogy a hisztamin H1-es receptorán a konformációnak lényeges szerepe van az aktivitásban [10]. Az 1. táblázatban néhány vegyület biológiai aktivitását soroltuk fel a H1 és H2 receptorokon.

A tény az, hogy a már majdnem diszkreditált Extended Hückel elmélet segítségével kiszámolt potenciál-felületek mégis realisztikusak, amint ezt a 2. táblázat számai alátámasztják.

1. táblázat

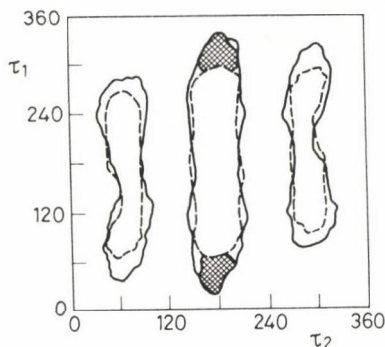
*Metilhisztaminok agonista aktivitása*

Vegyület	H1 aktivitás	H2 aktivitás
hisztamin	100	100
2-metil	165	4,4
3-metil	0,42	<0,1
4-metil	0,23	43,0
$\beta$ -metil	0,83	0,89
$\alpha$ -metil	0,36	0,74
N-metil	72,0	74,0
N,N-dimetil	44,0	51,0
$\alpha,4$ -dimetil	0,08	2,96—7,4

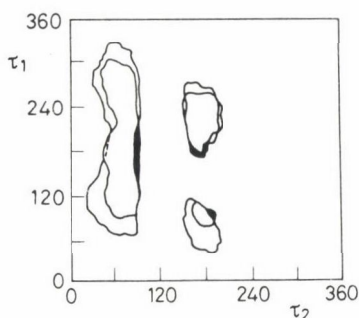
2. táblázat

*Néhány metilhisztamin antiperiplanáris konformereinek számított (EHT) és kísérleti (NMR) százalékos megoszlása*

Vegyület	% antiperiplanáris	
	EHT	NMR
3-metil	65	57
4-metil	65—75	57
N-metil	65	59
N,N-dimetil	80	72
N,N,N-trimetil	> 99	92



5. ábra. A hisztamin H1 aktivitáshoz lényeges konformáció (vonalkázott)



6. ábra. A hisztamin H2 aktivitáshoz lényeges konformáció (vonalkázott)

Az 5. ábra egy olyan Venn-diagrammra ad példát, mely három tagot mutat be egy sorozatból, amely arra a következtetésre vezet, hogy egy meglehetősen jól definiálható régiót jelölhetünk meg, mint „lényegest” az ilyen típusú aktivitás szempontjából. Ilyen nem-egyensúlyi konformáció felvételének a képessége szükséges, de nem elégséges feltétele a H1-en mutatott aktivitásnak.

Egészen a közelmúltban egy fantasztikus kísérleti eredmény (l. 1. táblázat) egy hasonló összehasonlítást tett lehetővé a még izgalmasabb H2 aktivitásra. A hisztamin önmagában, természetesen mindkét receptoron aktív, míg a 4-metil-hisztamin alig aktív a H1-en és körülbelül fele aktivitást fejt ki a H2-re, mint a természetes vegyület (ezt a tényt érvként felhasználtuk a H1 lényeges konformációjánál és a nagyon sikeres H2 antagonistáknál). Az  $\alpha$ -metil-hisztamin alig hatásos akármelyik receptoron. Viszont a dimetil vegyület, az  $\alpha$ -metil-4-metil-hisztamin H2 aktivitása nagyon megnőtt. Ez egy ritka példa a metilezés következtében fellépő aktivitás növekedésre, tehát inkább sztérikus segítés, mint gátlás.

A 6. ábra mutatja a hozzákapcsolódó Venn-diagrammot, mely hipotézist enged meg a H2 lényeges konformációjára.

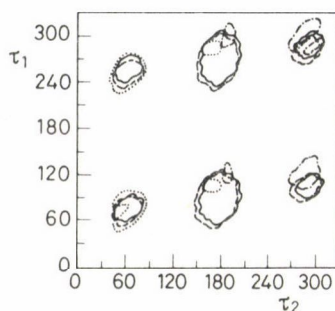
Ennek a munkának gyenge pontja az, hogy durva potenciális energia számításokra hagyatkozunk. Sajnos, még jobb módszereket alkalmazva erre a



különleges molekulára, az derült ki, hogy egy nagyon stabilis hidrogénkötés alakul ki az imidazol gyűrű nitrogén kötetlen elektronpárja és az oldallánc ammónium csoportja között. A módszerek, hogy oldószer inkorporációjával ezt megakadályozzák, nem eléggé megbízhatóak, úgy hogy a probléma valamennyire nyitott marad, óriási jelentősége ellenére.

### Dopamin

Hasonló természetű következtetéseket vonhatunk le a dopaminnak a D1 receptorra kifejtett hatásáról, bár kísérleti adatok hiánya nem teszi lehetővé, hogy határozott megállapításokat tehesünk. A dopamin és *N*-metil-dopamin egyforma hatásúak, de az  $\alpha$ - és  $\beta$ -metil-dopamin ugyan aktív, de kevésbé. A 7. ábra ennek a négy vegyületnek a populációs térképét mutatja, melyek összhangban vannak az NMR adatokkal.



7. ábra. Dopamin és szubsztituált dopaminok populációs térképei

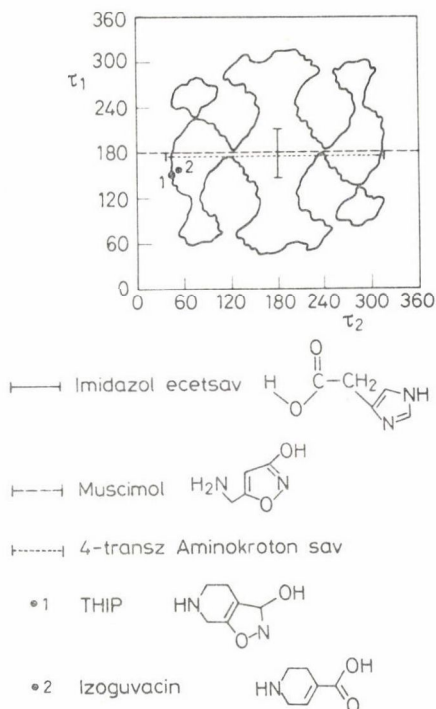
Az egyedüli konformációs tartomány, mely a dopamin és *N*-metil analógjának konformációs flexibilitását hasonlóvá, az  $\alpha$ - és  $\beta$ -vegyületeket megkülönböztethetővé teszi, az a tartomány, melyhez az antiperiplanáris alak tartozik ( $\tau_1 = 90^\circ$  vagy  $270^\circ$ ;  $\tau_2 = 180^\circ$ ). GROL és ROLLENA [11] vizsgálataik adnak némi támogatást ehhez az elképzeléshez, melyben az ADTN (2-amino-6,7-dihidroxi-tetrahidronaftalin) félmerev D1 agonistát vizsgálták. Az oxigén és nitrogén atom elkülönülése az ADTN ekvatoriális formájában hasonló a dopamin antiperiplanáris formájához. Ez nyilvánvalóan az az eset, mikor további kis agonista molekulák kipróbálása segíthetne és további komplikáltabb számításokra bátoríthatna.

### GABA ( $\gamma$ -aminovajsav)

A GABA esetén a számításokat komplikálja a GABA ikerion jellege, az izolált molekula számításokban az intramolekuláris töltés-töltés kölcsönhatások dominálnak. Nincs teljesen kielégítő válasz erre, bár szolvatált szupermolekula számítások [12] valószínűleg reálisok különböző megengedett stabil konformerek megjósolásában.

Mi a semleges nem-ionos formát választottuk, feltételezve, hogy a biológiai környezet meggátolja az intramolekuláris kölcsönhatásokat.

Biológiaiilag a GABA felismerő-hely egy szupramolekuláris komplex részének tűnik, mely a GABA-receptorból — mely benzodiazepineket köt meg — és egy ionoforból áll. A GABA agonistái a GABA kötőhelyeken kötődnek meg némi farmakológiai effektust kiváltva és a benzodiazepin kötődést is stimulálva.



8. ábra. GABA populációs térképe és néhány agonista lehetséges konformációja

A 8. ábra a semleges GABA *ab initio* módszerrel számított konformációs százalékos térképét mutatja. Szuperponálódott vonalak jelzik az agonisták flexibilitását egyetlen torziós szög variálásával és a pontok merev agonistákat jeleznek.

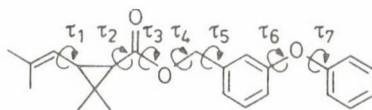
Legalább egy molekula (imidazol-ecetsav) kiesik a sorból, de egyébként a hipotézis a GABA egy formájára a közelítőleg  $\gamma_1 = 180^\circ$  és  $\tau_2 = 60^\circ$ -os szögekkel rendelkező konformert tekinti lényeges konformációjúnak.

Még egyszer ismétlem, nincs elegendő kísérleti adat ahhoz, hogy megbízható következtetésre jussunk és az elméleti módszerek is megkérdőjelezhetőek, de mégis egy munkahipotézishez juthatunk, és a számítások további kísérletekre sarkallnak, melyek próbára tehetik a hipotézist.

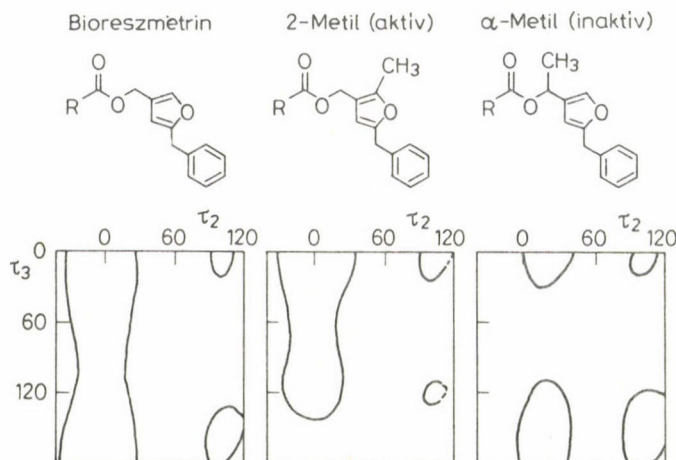
## Piretroidok

Az utolsó példát most agrokémiai területről vettük, dr. KEITH HERITAGE (ICI) értékes munkájából, vele szorosan együttműködve. (Ez önmagában is szép példa az elméleti módszerek hasznosságára a gyakorlati életben.)

A 9. ábrán egy szintetikus piretroid (permetrin) vázát mutatjuk be a hét torziós szögével.



9. ábra. Szintetikus piretroid hét torziós szöget feltüntetve



10. ábra. Biorezmetrin és néhány metil analógja

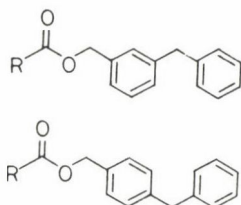
A nagy belső aktivitású szintetikus molekula a biorezmetrin látható a 10. ábrán két metil analógiával együtt; a 2-metil szubsztitúció kis aktivitás csökkenést okoz, míg az  $\alpha$ -szubsztitúció a hatékonyságot néhány nagyságrenddel csökkenti. A flexibilitás jelezte a mellékelt térképeken, hogy  $\tau_3$ -nak valahol  $0^\circ$  közelében kell lennie.

Amit dr. Heritage csinált, az az, hogy néhány valóban bonyolult molekula aktivitását racionalizálta a Venn-diagrammok használatának kiterjesztésével. A többi öt torziós szöget minimális energia értéken tartva, hogy egy kinyújtott konformáció jöjjön létre, mely, mint egy templát fajta hat. Az aktivitás változása látható, amint a külső aril gyűrűnek változik a kapcsolódásmódja (11. ábra).

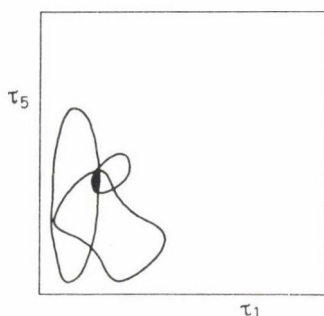
Így inkább lehetséges Venn-diagrammot felállítani minden molekulára, mint különböző molekulákat összehasonlítani. Minden egyes diagrammon három határvo-



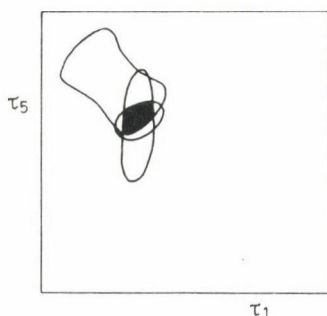
nal látszik; egy a konformációs flexibilitásnak felel meg, energia, ill. populációs kontúrokkal; a másodikat a konformációs variábilis külső gyűrű és a rögzített gyűrű közötti távolság szolgáltatja; a harmadik a két aril gyűrű által bezárt szög, arra a feltevésre alapozva, hogy párhuzamosnak és térben közelinek kell lenniük. A 12. és 13.



11. ábra. Analógok különböző aril szubsztituensekkel



12. ábra. m-benzil izomer-Venn-diagrammja



13. ábra. p-benzil izomer-Venn-diagrammja

ábrákon olyan Venn-diagrammokat mutatunk be két példán, ahol a külső gyűrű meta és para helyzetben kapcsolódik. Az előző esetben sok átfedés van a  $\tau_4$ – $\tau_5$  diagrammban, de nagyon kevés közös terület van a para példában, ahol rosszabb illeszkedés miatt egy kevésbé aktív izomert kapunk.

## Diszkusszió

A jelen munka gyengeségeit hangsúlyoznunk kell. A konformációs potenciális energia számítására egyik elméleti módszer sem teljesen kielégítő, ha olyan molekulákra alkalmazzuk, melyek bonyolult környezetben vannak. Az egyetlen járható út, az oldószer beépítése Monte-Carlo számítások segítségével, csak modell rendszerekre korlátozódik és erősen függ a választott potenciáloktól. E téren végzett saját munkánk azt jelzi, hogy a víz-víz kölcsönhatás a szolvatálási energiát 0,7 nm-en túl befolyásolja az oldott anyagtól.

E nehézségek és megfelelő biológiai mérések hiánya ellenére lehetséges hipotéziseket felállítani olyan konformációk létezéséről, melyek lényegesek az aktivitás szempontjából. Nem tudunk olyan pontosak lenni, mint ahogy az a követelmények szempontjából szükséges lenne. Lehet, hogy a konformáció a receptor tükörképe, de éppúgy lehet az is, hogy a molekulának fel kell venni egy konformációt, hogy kötődhessen a receptorhoz.

Ezek a konformációk lehetnek nem-egyensúlyi konformációk is.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A hisztaminnal és dopaminnal Sanda Robins végezte a vizsgálatokat, a GABA-val végzett vizsgálatokat PETER DAVIES végezte.

## Összefoglalás

Különböző biológiai hatású, de fizikailag és kémiaiilag hasonló molekulák sorozatában lehetséges hipotézist felállítani a hatás szempontjából lényeges konformációkról. Ezt a Venn diagrammok segítségével tehetjük meg, melyek jelzik a flexibilis molekulák számára kihasználható konformációs teret. Ezt a megközelítést mutatjuk be a hisztamin, dopamin, GABA és szintetikus piretroidok esetére. Az aktivitás szempontjából lényeges konformáció lehet nem-egyensúlyi forma.

## Summary

Given a series of chemically and physically similar molecules with varying biological effects, it is possible to produce hypotheses about conformations essential for activity. This may be done using Venn diagrams which indicate areas of conformational space available to flexible molecules. This approach is illustrated by reference to histamine, dopamine, GABA and synthetic pyrethroids. The essential conformation may not be an equilibrium form.

## IRODALOM

1. W. G. RICHARDS, D. G. ASCHMAN, J. HAMMOND, J. Theoret. Biol., 52, 223 (1975)
2. R. J. P. WILLIAMS, Biol. Rev., 54, 389 (1979)
3. A. J. HARMAR, A. S. HORN, Molec. Pharm., 13, 512 (1977)
4. J. H. BROWN, M. H. MAKMAN, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 539 (1972)

5. L. L. IVERSON, *Science*, *188*, 1084 (1975)
6. J. W. KEBABIAN, D. B. CALNE, *Nature*, *277*, 933 (1979)
7. J. HILL, P. W. BOWEY, *Nature*, *290*, 149 (1981)
8. J. W. BLACK, *Nature*, *236*, 385 (1972)
9. L. FARNELL, W. G. RICHARDS, C. R. GANELLIN, *J. Theoret. Biol.*, *43*, 389 (1974)
10. L. FARNELL, W. G. RICHARDS, C. R. GANELLIN, *J. Med. Chem.*, *18*, 662 (1975)
11. C. J. GROL, H. J. ROLLENA, *J. Pharm. Pharmac.*, *29*, 153 (1977)
12. B. PULLMAN, H. BERTHOD, *Theoret. Chim. Acta*, *36*, 317 (1975)



## KVANTUMKÉMIAI SZÁMÍTÁSOK ALKALMAZÁSA IONHORDOZÓK TERVEZÉSÉBEN

E. PRETSCH, J. BENDL, P. PORTMAN, M. WELTI

(Department of Organic Chemistry, Swiss Federal Institute of Technology, CH-8092 Zürich, Svájc)

### Bevezetés

Ionhordozók vagy ionofórok lipofil komplexképző ágensek, melyek képesek vizes oldatokból ionokat lipofil membrán fázisba átvinni és ezeket az ionokat ilyen akadályokon átsegíteni karrier transzlokáció segítségével [1]. Néhány, természetben előforduló semleges hordozó hatását MOORE és PRESSMAN fedezte fel biológiai membrán rendszerekben 1964-ben [2]. Ezeknek az antibiotikumoknak alapvető sajátosságát, nevezetesen azt a szerepüket, hogy nagyon szelektív komplexképző ágensek alkálifém ionokra, STEFANAC és SIMON derítette fel néhány évvel később [3]. Szintetikus komplexképző ágensek alkáli és alkáliföldfém kationokra [4–7] ionofórként viselkedhetnek, ha a következő feltételeket teljesítik (l. még [6]):

1. A hordozó molekulának lipofilnek kell lenni, hogy a membrán fázisban maradhasson.

2. A hordozó molekulának olyan komplexképző ágensnek kell lenni, amely képes ionokat a membrán fázisba átvinni. Az extrakciós konstansnak olyan alacsonynak kell lenni, hogy a ligandum molekulák zöme ne legyen komplexált formában [8], ha nincsenek lipofil, ellenkező töltésű ionok beágyazódva a membrán fázisba [9] (l. még [10]).

3. Az ionok extrakciójának és kibocsátásának, valamint a komplex diffúziójának gyorsnak kell lenni [11].

4. A gyakorlati alkalmazás szempontjából, pl. ion-szelektív membrán elektródokban [12], nagy szelektivitás kívánatos.

A legnehezebb feladat a hordozó molekulák tervezésében a nagy ion-szelektivitás elérése. Jelen cikkben kvantumkémiai számítások alkalmazását fogjuk tárgyalni a szelektivitás becslésére. Az ion-szelektivitást általában a  $K_{ij}$  szelektivitási tényezővel írják le, mely a J ion kedvezményezettségének a mértéke az I ionnal szemben a membránban. Ezek transzport kísérletekkel ( $K_{ij}^{Tr}$ ) vagy még kényelmesebben potenciometriásan mérhetők ( $K_{ij}^{Pot}$ ) olyan membránelektrodokat alkalmazva, melyek a vizsgált ligandumot tartalmazzák. Több feltétel teljesülését feltéve [7, 10] mindkét szelektivitási faktort a megfelelő extrakciós konstansok,  $K_{ext}$  arányával közelíthetjük:

$$K_{ij}^{Tr} \approx K_{ij}^{Pot} \approx \frac{K_{ext}(J)}{K_{ext}(I)} \approx \frac{K_w(J)}{K_w(I)} \quad (1)$$

Az extrakciós konstans a nem-komplexált ion vízben és a komplexált ion egyensúlyát írja le a membrán fázisban. Az extrakciós konstansok arányát a hordozó molekulák vízben mért  $K_w$  komplexképződési állandók arányával is közelíthetjük [7]. Az itt leírt módszerek lehetővé teszik az ion-ligandum kölcsönhatási energiák becslését gáz fázisban. Ezek a kölcsönhatási energiák a  $\Delta H$ -t közelítik [13] a megfelelő reakcióra. Még ha ezek az energiaértékek jó közelítések lennének  $\Delta G$ -re, az eltéréseket a számított és megfigyelt szelektivitások között az inkább drasztikus feltevések okozhatnák az (1) egyenlet származtatásánál [7, 10].

### **Ionok és kis ligandum molekulák kölcsönhatási energiáinak számítása**

Mivel az ion-ligandum kölcsönhatási energiák számítására szolgáló különböző módszerekről újabban néhány kitűnő összefoglaló jelent meg [14, 15] ezért itt csak rövid áttekintést adunk.

Néhány esetben a klasszikus elektrosztatikus modellek kellően pontos relatív kölcsönhatási energiákat és egyensúlyi geometriákat adnak meg [14]. Ezt a modellt használva, egy vízmolekula és alkálifém ionok kölcsönhatási energiájára kapott eredmény [16] csak néhány százalékkal tér el a gáz fázisban mért kísérleti értékektől [17]. Nagyszámú kation számított hidratációs szabadenergiája átlagosan 3,9%-kal tér el a kísérleti értékektől [17]. De ennek a modellnek csak kvalitatív jelentősége van valódi ionofórok esetén [18] mivel nem áll rendelkezésre elegendő adat a paramétereikről. Molekuláris elektrosztatikus potenciálokat kvantumkémiaili számításokkal kaphatunk meg [19] és ionok és kis ligandum molekulák kölcsönhatási energiájának számítására használhatjuk [20]. Ezeket használták kiindulásként egy additív sémában, mely megközelíti az ab initio számításokat [21].

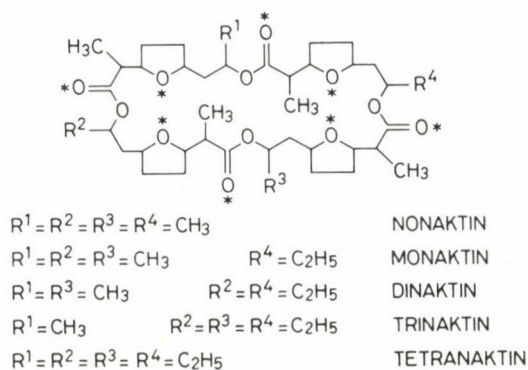
Az ion-ligandum kölcsönhatások számítására eddig alkalmazott szemiempirikus kvantumkémiaili eljárások nagyon gyakran vezettek nem-realisztikus eredményekre, mint pl. téves geometria, rendkívül túlhangsúlyozott töltésátvitel és irreális kölcsönhatási energiák (l. részletesen [14]).

Kis ligandum molekulák kölcsönhatását különböző kationokkal ab initio számításokkal A. PULLMAN [22–30] és mások [14, 31–32] vizsgálták. Ellentétben a szemiempirikus módszerekkel az ab initio számítások képesek arra, hogy korrekt kölcsönhatási energiákat és geometriákat adjanak. Óvatosság szükséges, ha kis bázis készletet alkalmazunk. A komplexben az ion és ligandum bázis készletének szuperpozíciója miatt az összetevők a komplexben jobban leírtak, mint izolált molekulák. Emiatt túl negatív energiákat kapunk a komplexben, az izolált molekulához képest s ebből következően túl nagy kölcsönhatási energiákat. Ez a „báziskészlet szuperpozíciós hiba” [33, 34] akár a valódi kölcsönhatási energia 100%-át is elérheti, ha nem megfelelő báziskészleteket, mint pl. STO-3G-t használunk. A báziskészlet kiválasztását gondosan elemezték [28, 34], és jól kiegyenlített báziskészletek állnak rendelkezésre, melyek érzéketlenek a báziskészlet szuperpozíciós hibákra [35, 36].



Sajnálatos módon még ilyen kis báziskészletekkel is a számítási követelmények teljesíthetetlenek olyan ab initio számításokban, melyek 1500 relativ molekulatömegű ionofór-ion komplexekre vonatkoznak.

Kis molekulák komplexeire végzett számítások mégis némi betekintést adhatnak a nagy molekulák komplexképző sajátságaira. Az *N*-metilacetamidot és metilacetátot választották modellvegyületnek a  $K^+$ -szelektív ciklodepsziptid, valinomycin,  $Na^+$  és  $K^+$  ionokkal fellépő kölcsönhatásának tanulmányozására [22]. Hasonlóan különböző nukleinsav alkotórészek és ionok kölcsönhatását tanulmányozták ab initio számításokkal [27, 30–31].



1. ábra. A makrotetrolid antibiotikum szerkezete

A makrotetrolid antibiotikumok (l. 1. ábra) szelektivitást mutatnak az  $NH_4^+$  javára a  $K^+$ -ionnal szemben [37]. A  $K^+$ -komplex röntgendiffrakciós vizsgálata [38] azt mutatta, hogy a káliumiont négy karbonil és négy tetrahydrofuran oxigénatom koordinálja (l. a csillagokat az 1. ábrán), melyek közel oktaéderes elhelyezkedéssel veszik körül a központi atomot. Spektroszkópiai vizsgálatok jelezték [39] és röntgendiffrakciós analízis igazolta [40, 41], hogy a megfelelő  $NH_4^+$ -komplexben az ammóniumion hidrogénkötéseket képez a tetrahydrofuran oxigén atomjaival. Ezt a némileg meglepő eredményt a  $K^+$  és  $NH_4^+$ -ionok a kis ligandum molekulák között fellépő kölcsönhatás ab initio számítása is tükrözi, amely a kölcsönhatási energiák következő sorrendjét adta [42]:



Párhuzamba állítva a makrotetrolid antibiotikumokkal az  $NH_4^+$ -ion készségesebben koordinálódik éterkötésű oxigénhez (és amin nitrogénhez), mint ketokarbonil vagy észterkarbonil oxigénatomhoz. A tény, hogy az  $NH_4^+$  kölcsönhatása aminnal erősebb, mint éterrel, amint ezt a sorrend is mutatja, összhangban van az  $NH_4^+$ ,  $NH_3$  és  $H_2O$



gázfázisú kölcsönhatásánál talált kísérleti megfigyelésekkel [43] és a makroheteropoli-ciklusos ligandum és  $\text{NH}_4^+$  komplexének szerkezetével [44], amelyben az  $\text{NH}_4^+$  protonok az amin nitrogénatomot koordinálják.

Bár az ilyen vizsgálatok hasznosak az ion-ligandum kölcsönhatások megértéséhez és új, szelektív ionofór molekulák tervezéséhez, nyilvánvaló okok miatt csak korlátozott érvényűek. Nagy molekulák és ionok kölcsönhatási energiáinak kvantitatív előrejelzése ilyen számítások alapján [45] kétséges.

### Ion-ligandum kölcsönhatási energiák becslése additív eljárással

Mivel az *ab initio* számítások realisztikus ionofór molekulák esetén nem jöhetnek szóba és kevésbé bonyolult számítások sem megfelelőek az ilyen kölcsönhatások leírására, additív sémákat javasoltak [21, 46–48], hogy reprodukálhatóak legyenek az *ab initio* számítások eredményei.

Egy modell ad lehetőséget, amely *ab initio* számításokat használva ionok és kis ligandum molekulák kölcsönhatására és ezeket az ion-ligandum kölcsönhatásokat az atom-ion kölcsönhatások páronkénti összegezésével írja le:

$$E_{\text{Tot}} = E_{\text{ion}} + E_{\text{Ligand}} + E_{\text{Int}}, \quad (2)$$

ahol  $E_{\text{Tot}}$  a rendszer teljes energiája,  $E_{\text{ion}}$  az ion,  $E_{\text{Ligand}}$  a ligandum és  $E_{\text{Int}}$  az ion-ligandum kölcsönhatási energiája.

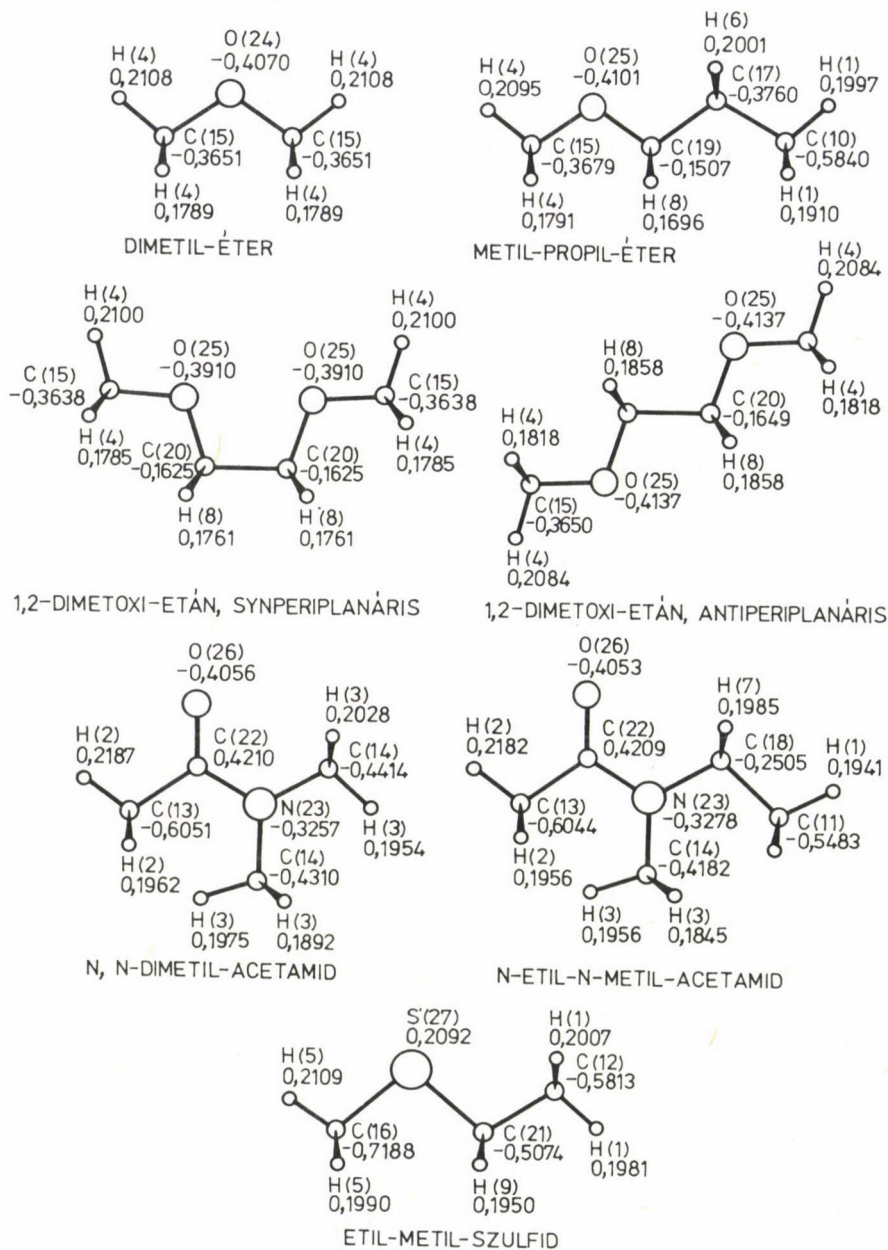
$$E_{\text{Int}} = \sum_i^n e_{\text{Int}, i}, \quad (3)$$

ahol  $e_{\text{Int}, i}$  az  $i$ -edik atom kölcsönhatási energiája az ionnal és  $n$  az atomok száma a molekulában. A páronkénti kölcsönhatást egy egyszerű függvény írja le:

$$e_{\text{Int}, i} = -A_i/r_i^6 + B_i/r_i^{12} + C_i q_i q_{\text{ion}}/r_i, \quad (4)$$

ahol  $r_i$  az  $i$ -edik atom távolsága az iontól,  $q_i$  és  $q_{\text{ion}}$  az  $i$ -edik atom és az ion netto töltései. Az  $A_i$ ,  $B_i$  és  $C_i$  konstansokat az *ab initio* számításokkal nyert kölcsönhatási energiákból a legkisebb négyzetek módszerével határoztuk meg. Hasonló atomokat, hasonló kémiai környezetben (az összes  $\alpha$ - és  $\beta$ -szomszédoknak ugyanaz az atomszáma és hibridizációja) azonos osztályba soroltuk és ugyanazt a konstanst rendeltük hozzá.

Egy sorozat modell ligandumra, mint éterek, tioéterek és amidok (l. 2. ábra)  $\text{Li}^+$  ionnal [48],  $\text{Na}^+$  ionnal [47] nagyszámú kölcsönhatási energiát számítottak (l. még [49]). Ezeket a kölcsönhatási energiákból [49] származtatott paramétereket használva (l. 1. és 2. táblázat) a legkisebb négyzetek átlagos deviációja a pár-potenciálok és az *ab initio* számítások között  $7,6 \text{ kJmol}^{-1}$  a  $\text{Li}^+$ -ra és  $5,0 \text{ kJmol}^{-1}$  a  $\text{Na}^+$ -ra 410 és 398 komplex esetén.



2. ábra.  $\text{Li}^+$  és  $\text{Na}^+$  pár-potenciálok levezetéséhez felhasznált molekulák képletei, az atomok melletti értékek a netto töltések, zárójelben az atomtípus

1. táblázat

Az atomi pár-potenciálok illesztési konstansai a  $Li^+$  és 27 vizsgált atom osztály kölcsönhatására (l. 2. ábra) és az egyes osztályokhoz tartozó atomok átlagos nettó töltése

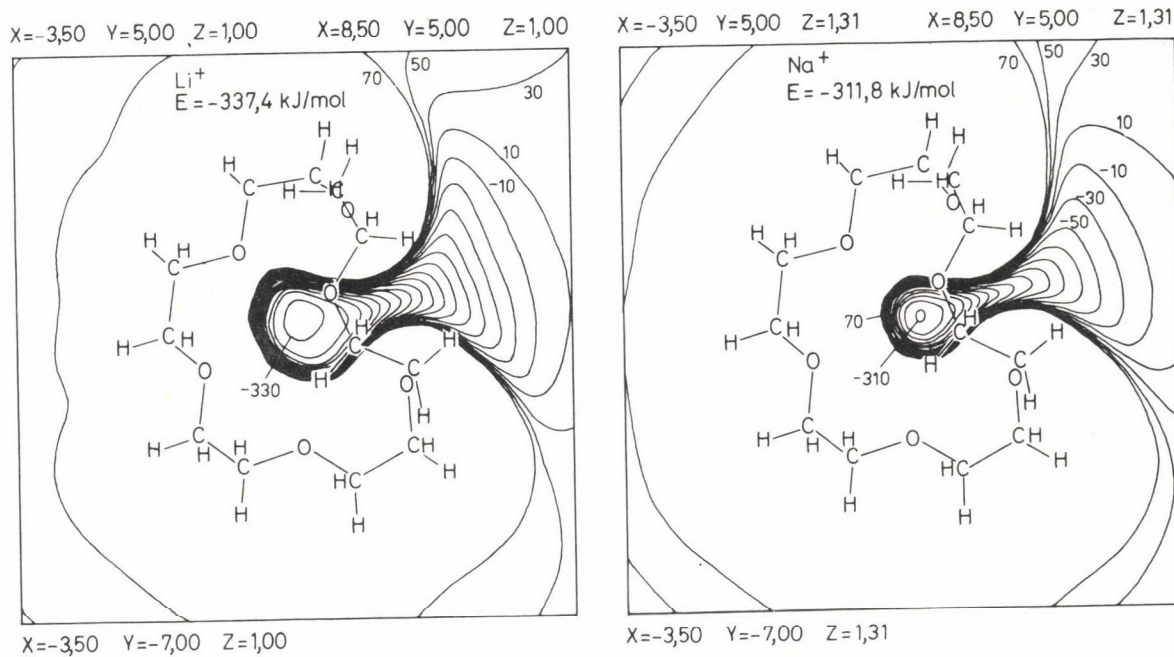
Atom	Csoport	Nr.	Kód	A	B	C	Töltés
H	CH3	1	HC(H2C)	.21529204E+3	.44658586E+4	.12006232E+4	.1937
		2	HC(H2C *)	-.10778636E+4	.19706770E+5	.95499946E+3	.2034
		3	HC(H2N)	.77487744E+3	.16845973E+5	.11424012E+4	.1936
		4	HC(H2O)	.10589388E+4	.20877512E+5	.98286799E+3	.1896
		5	HC(H2S)	.25090536E+4	.44083788E+5	.10775731E+4	.2030
H	CH2	6	HC(HC2)	.15233700E+3	.18552733E+5	.11079632E+4	.2001
		7	HC(HCN)	-.11734982E+3	.83669529E+4	.46453246E+3	.1985
		8	HC(HCO)	-.18108997E+3	.27861957E+5	.91733056E+3	.1772
		9	HC(HCS)	.57705798E+4	.11458040E+6	.14554850E+4	.1950
C	CH3	10	CH3 C(H2C)	-.20387369E+4	.10687538E+6	.13073622E+4	-.5840
		11	CH3 C(H2N)	-.11592840E+4	.41840342E+4	.13402899E+4	-.5483
		12	CH3 C(H2S)	-.11592750E+4	.73368810E+6	.15896296E+4	-.5813
		13	CH3 3*(=ON)	.25868173E+5	.22577523E+7	.12349154E+4	-.6048
		14	CH3 N(CC*)	-.56624602E+3	.36580699E+6	.15922833E+4	-.4302
		15	CH3 O(C)	.23410150E+4	.90329349E+6	.11067910E+4	-.3655
		16	CH3 S(C)	-.14339720E+5	.15181904E+6	.10428508E+4	-.7188
C	CH2	17	CH2 C(H3) C(H2O)	.38203888E+4	.40637051E+6	.13090311E+4	-.3760
		18	CH2 C(H3) N(CC*)	-.73632211E+3	.74627593E+5	.71896189E+3	-.2505
		19	CH2 C(H2C) O(C)	.15659997E+3	.64751753E+6	.68821727E+2	-.1507
		20	CH2 2(H2O) O(C)	.92572372E+4	.38385147E+7	.71420284E+3	-.1637
		21	CH2 C(H3) S(C)	-.16731097E+5	.79901631E+5	.61594137E+3	-.5074
C	C=	22	C* C(H3) N(CC) =O	-.40277995E+4	.65740449E+5	.22597465E+4	.4210
N	N	23	N C(H3) C(H3) C*(=OC)				
			N C(H3) C(H2C) C*(=OC)	.88339296E+3	.41840342E+4	.21919181E+2	-.3268
O	O	24	O C(H3) C(H3)	.90558073E+3	.25615688E+5	.79821144E+3	-.4070
		25	O C(H3) C(H2C)	.20964567E+3	.10886299E+5	.90641147E+3	-.4056
O	O=	26	O* =C(CN)	.59595422E+2	.10679740E+5	.18673780E+4	-.4054
S	S	27	S C(H3) C(H2C)	.45778610E+4	.44014939E+6	.0	.2092



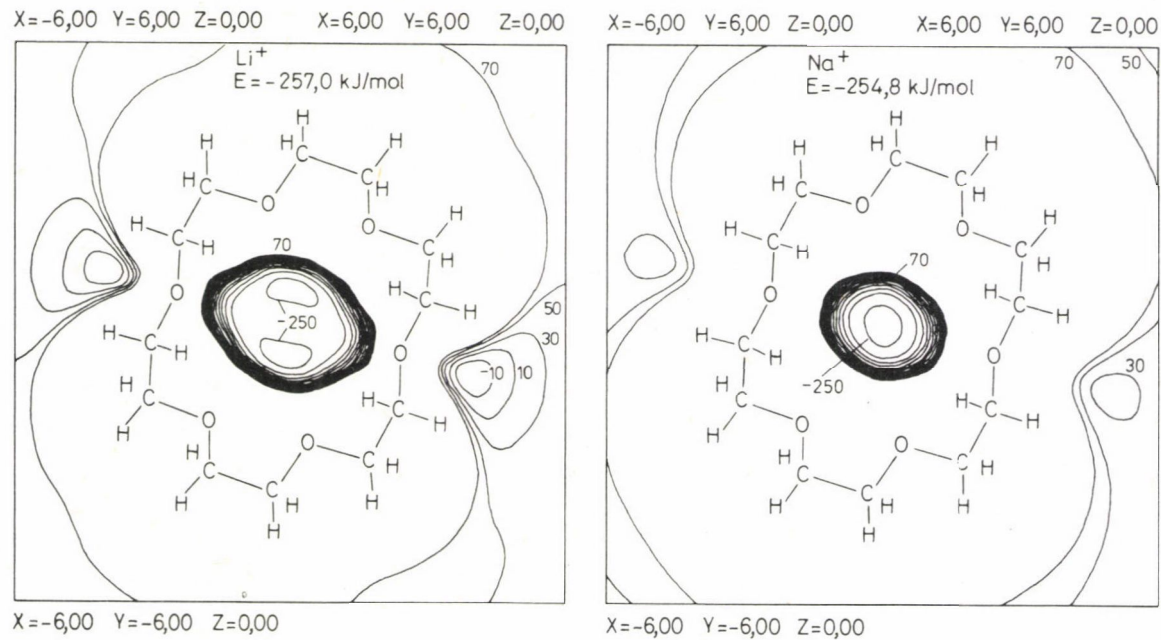
2. táblázat

Az atomi pár-potenciálok illesztési konstansai a  $\text{Na}^+$  és 27 vizsgált atom osztály kölcsönhatására (l. 2. ábra) és az egyes osztályokhoz tartozó atomok átlagos nettó töltése

Atom	Csoport	Nr.	Kód	A	B	C	Töltés
H	CH3	1	HC(H2C)	.14318757E+4	.53469865E+5	.12817330E+4	.1937
		2	HC(H2C*)	.73806359E+3	.32049598E+5	.89293446E+3	.2034
		3	HC(H2N)	.20492733E+4	.16123532E+6	.11651710E+4	.1936
		4	HC(H2O)	.89207597E+3	.40097051E+5	.12140108E+4	.1896
		5	HC(H2S)	.12282063E+4	.35192129E+5	.13223961E+4	.2030
H	CH2	6	HC(HC2)	.39720699E+3	.47091832E+5	.12368204E+4	.2001
		7	HC(HCN)	.70958069E+3	.99752944E+5	.92300189E+3	.1985
		8	HC(HCO)	-.42324665E+4	.24405929E+5	.12157267E+4	.1772
		9	HC(HCS)	.26846065E+4	.10336030E+6	.13102600E+4	.1950
C	CH3	10	CH3 C(H2C)	-.49951586E+4	.81234300E+6	.13725371E+4	-.5840
		11	CH3 3(H2N)	-.74084652E+4	.41840342E+4	.14298159E+4	-.5483
		12	CH3 C(H2S)	-.10208857E+5	.14727157E+6	.14263018E+4	-.5813
		13	CH3 C*(=ON)	-.38401615E+3	.23422859E+7	.12120375E+4	-.6048
		14	CH3 N(CC*)	-.16112379E+4	.18309889E+7	.15881255E+4	-.4302
		15	CH3 O(C)	.19181026E+4	.19350394E+7	.15116895E+4	-.3655
		16	CH3 S(C)	-.81927251E+4	.41840342E+4	.11944068E+4	-.7188
C	CH2	17	CH2 C(H3) C(H2O)	-.12845463E+4	.27483030E+6	.11935313E+4	-.3760
		18	CH2 C(H3) N(CC*)	-.42790540E+4	.73585768E+6	.12618824E+4	-.2505
		19	CH2 C(H2C) O(C)	.33534705E+4	.22250341E+7	.17052729E+4	-.1507
		20	CH2 C(H2O) O(C)	.12885004E+5	.98888217E+7	.15500887E+4	-.1637
		21	CH2 C(H3) S(C)	-.94056357E+4	.41840342E+4	.85046871E+3	-.5074
		22	C* C(H3) N(CC) =O	.37721950E+4	.44989752E+6	.22065188E+4	.4210
C	C=						
N	N	23	N C (H3) C(H3) C*(=OC)				
			N C(H3) C(H2C) C*(=OC)	-.49099453E+3	.41840342E+4	.0	-.3268
O	O	24	O C(H3) C(H3)	-.11333408E+4	.24878825E+5	.74292698E+3	-.4070
		25	O C(H3) C(H2C)	.41338516E+3	.98101096E+5	.76996145E+3	-.4056
O	O=	26	O* =C(CN)	-.21462606E+2	.92818431E+5	.18820719E+4	-.4054
S	S	27	S C(H3) C(H2C)	.95660005E+4	.21513236E+7	.0	.2092



3. ábra. A 18-korona-6 molekula  $\text{Li}^+$  (bal) és  $\text{Na}^+$  (jobb) ionokkal való kölcsönhatásának izoenergia szintvonalas térképe a ligandum  $\text{Na}^+$  komplexének konformációjában



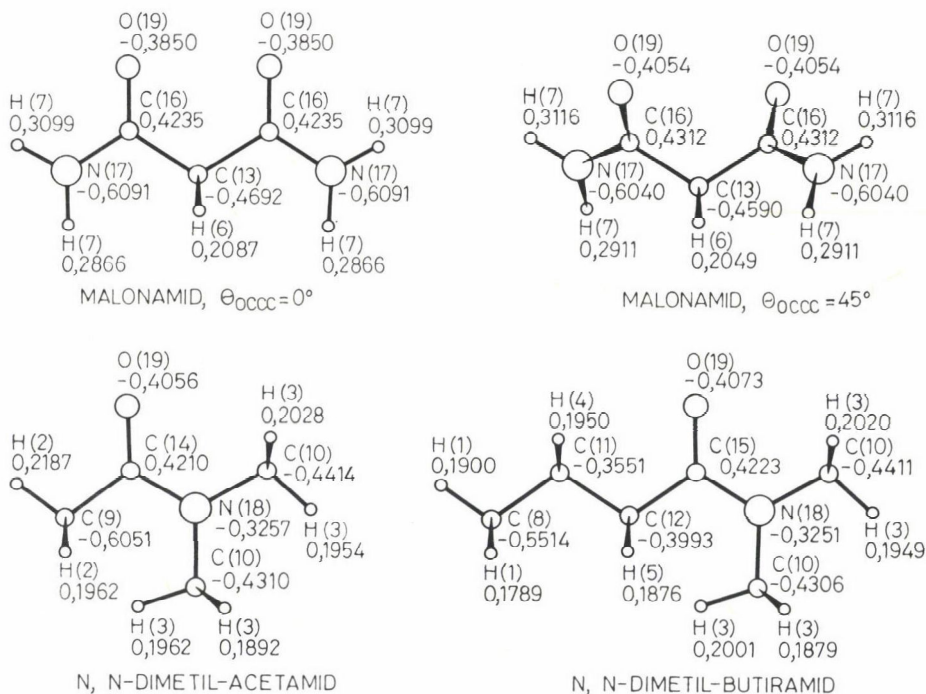
4. ábra. A 18-korona-6 molekula  $\text{Li}^+$  (bal oldal) és  $\text{Na}^+$  (jobb oldal) ionokkal való kölcsönhatásának izoenergia szintvonalas térképe a  $\text{K}^+$  kölcsönhatásának izoenergia szintvonalas térképe a  $\text{K}^+$  komplexben tapasztalt konformációban



A 18 korona-6  $\text{Li}^+$  és  $\text{Na}^+$  ion kölcsönhatását a pár-potenciálokkal analizálva az 1. és 2. táblázatban foglaltuk össze [49].

A ligandum molekulára három különböző konformációt vettünk számításba: egyet a szabad ligandumra [50] (relatív konformációs energia:  $0,0 \text{ kJmol}^{-1}$  [51]), egyet a  $\text{Na}^+$  komplexre [52] (relatív konformációs energia:  $18,4 \text{ kJmol}^{-1}$  [51]), és egyet a  $\text{K}^+$  komplexre [53] (relatív konformációs energia:  $32,8 \text{ kJmol}^{-1}$  [51]). Csak nagyon gyenge stabilizáló kölcsönhatás alakul ki a  $\text{Li}^+$  és  $\text{Na}^+$  ionok és a 18 korona-6 között a szabad ligandum konformációban [49]. Ha a  $\text{Na}^+$  komplexnél meghatározott konformációt tételezzük fel, a modell úgy a  $\text{Na}^+$ -ot, mind a  $\text{Li}^+$ -ot 20 pm-en belülré irányítja attól a helytől, ahol a  $\text{Na}^+$ -ot találták a röntgendifrakciós vizsgálat alapján (l. 3. ábra). A ligandum  $\text{K}^+$  komplexének konformációjában a modell a  $\text{Na}^+$ -ot pontosan ugyanabba a helyzetbe irányítja, amit a  $\text{K}^+$  esetében találtak (l. 4. ábra jobb oldala). A  $\text{Li}^+$ -ra viszont egy kettős minimumot találtak (l. 4. ábra bal oldala). A  $\text{Na}^+$  és a ligandum számított kölcsönhatási energiája a  $\text{Na}^+$  komplex konformációjában ( $-311,8 \text{ kJmol}^{-1}$ ) jelentősen nagyobb, mint a ligandum kölcsönhatása a  $\text{K}^+$  komplexnek megfelelő konformációban ( $-254,8 \text{ kJmol}^{-1}$ ).

A  $\text{Mg}^{2+}$  kölcsönhatási energia ab initio számításai alapján az 5. ábrán feltüntetett ligandumokkal pár-potenciálokat származtattunk 19 atom osztályra (3.

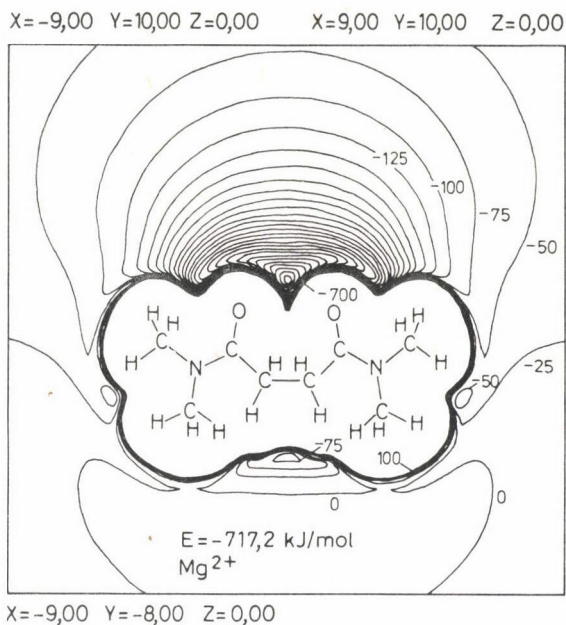


5. ábra. Az  $\text{Mg}^{2+}$  pár-potenciálok levezetéséhez felhasznált molekulák, az atomok melletti számok a nettó töltések, a zárójelben az atom osztályok

## 3. táblázat

Az atomi pár-potenciálok illesztési konstansai a  $Mg^{2-}$  és 19 vizsgált atom osztály kölcsönhatására (l. 4. ábra) és az egyes atom osztályokhoz tartozó atomok átlagos nettó töltése

Atom	Csoport	Nr.	Kód	A	B	C	Töltés
H	CH3	1	HC(H2C)	.17245812E+4	.25186927E+5	.0	.1826
		2	HC(H2C*)	.25666014E+4	.20376073E+5	.18151505E+4	.2037
		3	HC(H2N)	.66878978E+3	.86588721E+4	.68679725E+3	.1960
H	CH2	4	HC(HC2)	.50701962E+4	.95998956E+5	.23538237E+3	.1950
		5	HC(HCC*)	.17511771E+4	.31667805E+5	.27274410E+2	.1876
		6	HC(HC*2)	-.32218485E+4	.65160272E+5	.33567083E+3	.2068
H	HN2	7	HN(HC*)	.21476798E+4	.52198886E+5	.15821823E+4	.2998
C	CH3	8	CH3 C(H2C)	-.79656789E+4	.18609189E+5	.11501080E+3	-.5514
		9	CH3 C*(=ON)	-.25255938E+4	.18695464E+7	.27287003E+4	-.6051
		10	CH3 N(CC*)	.13625028E+5	.20840745E+7	.55296713E+3	-.4360
C	CH2	11	CH2 C(H3) C(H2C*)	-.30270296E+4	.12927421E+7	.0	-.3551
		12	CH2 C(H2C) C*(=ON)	.14827716E+5	.31857273E+7	.78183815E+3	-.3993
		13	CH2 C*(=ON) C*(=ON)	.15675094E+5	.10000000E+4	.21035622E+4	-.4641
C	C=	14	C* C(H3) N(C2) =O	.15102257E+5	.49196296E+6	.46856776E+4	.4210
		15	C* C(H2C) N(C2) =O	.16718558E+5	.59324806E+6	.40044250E+4	.4223
		16	C* C(H2C*) N(H2) =O	.18823508E+5	.20891518E+7	.41640676E+4	.4273
N	NH2	17	NH2 C*(=OC)	-.18009169E+4	.26274665E+5	.20687339E+4	-.6066
N	N	18	N C(H3) C(H3) C*(=OC)	-.65533487E+4	.10121243E+4	.21983610E+4	-.3254
O	O=	19	O* =C(CN)	-.19796001E+4	.29385040E+5	.27269974E+4	-.3990



6. ábra. Izoenergia szintvonalas térkép az Mg<sup>2+</sup>, N,N,N',N'-tetrametil szukcinimid kölcsönhatásra. A konformációt a  $\theta_{\text{OCC}} = 60^\circ$ ,  $\theta_{\text{CCC}} = -90^\circ$  és  $\theta_{\text{CCCO}} = 60^\circ$  torziós szög értékek rögzítik

táblázat) [54]. A legkisebb négyzetek átlagos eltérése a pár-potenciálok és az ab initio számítások között 14,1 kJmol<sup>-1</sup> 259 komplexre (a legnagyobb számított kölcsönhatási energia -675,4 kJmol<sup>-1</sup>). Ezeknek a pár-potenciáloknak az alkalmazása az N,N,N',N'-tetrametilszukcinamidra -717,2 kJmol<sup>-1</sup> kölcsönhatási energiát adott (l. 6. ábra), mely közel áll az ab initio számítással kapott értékhez az ion azonos pozíciója esetén (-705,2 kJmol<sup>-1</sup>).

### Következtetés

Jelen tanulmány mutatja, hogy a kiválasztott modell vegyületek ionokkal történő kölcsönhatására végzett ab initio számítások eredményeit felhasználhatjuk a komplexképző jellemzők becslésére, mint pl. kölcsönhatási energiák és nagy molekulák komplexeinek szerkezete. Az alkalmazott additív módszer a kölcsönhatási energiák nagyon gyors számítását teszi lehetővé (ezredmásodperces nagyságrend), így az energia hiperfelület analízise ionok és realisztikus ionofór molekulák kölcsönhatására lehetővé válik.

### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezt a munkát részben a Swiss National Science Foundation támogatta.



## Összefoglalás

A kation ligandum kölcsönhatás ab initio számításainak eredményeit additív eljárással közelítettük. A modellt, melyet eredetileg Clementi javasolt víz és nagy molekulák kölcsönhatásának leírására, képes úgy a hordozó molekulák komplexeinek a szerkezetét, mind a megfelelő kölcsönhatási energiákat megjósolni. A szükséges paramétereket az ionok és kis modell vegyületek kölcsönhatási energiáinak SCF—LCAO—MO számításával kaptuk és ezeket a kölcsönhatási energiákat egyszerű formájú analitikus potenciálfüggvényekkel illesztettük. Az így nyert atom-ion pár-potenciálok átvihetők, azaz a vizsgált ionok molekulákkal történő kölcsönhatásának energiáinak eltér azoktól, melyeket a modell számításoknál ezek az analitikus potenciálok helyesen írnak le.

## Summary

The results of ab initio calculations on cation-ligand interactions are approximated by an additive procedure. The model originally proposed by Clementi for the description of the interaction of water with large molecules enables the prediction of both the structure of complexes of carrier molecules with various ions as well as the corresponding interaction energies. The necessary parameters were obtained by SCF—LCAO—MO computations of the interaction energies of ions with small model molecules and fitting these interaction energies with an analytical potential function of simple form. The derived atom-ion pair potentials are transferable, i.e. the energy minimum for the interaction of the investigated ions with molecules different from those used the model calculations is properly described by using these analytical potentials.

## IRODALOM

1. YU. A. OVCHINNIKOV, V. T. IVANOV, A. M. SHKROB, *Membrane-Active Complexones* (BBA Library 12), Elsevier, Amsterdam, 1974.
2. C. MOORE, B. PRESSMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 562 (1964).
3. Z. STEFANAC, W. SIMON, *Chimia*, **20**, 436 (1966); *Microchem. J.*, **12**, 125 (1967).
4. C. J. PEDERSEN, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2495; 7017 (1967); **92**, 386; 391 (1970).
5. J.-M. LEHN, *Structure and Bonding*, **16**, 1 (1973).
6. W. E. MORF, D. AMMANN, R. BISSIG, E. PRETSCH, W. SIMON, in „Progress in Macrocyclic Chemistry”, Vol. 1, p. 1, R. M. Izatt and J. J. Christensen (eds.), Wiley-Interscience, New York, 1979.
7. N. S. POONIA, A. V. BAJAJ, *Chem. Reviews*, **79**, 389 (1979).
8. R. BÜCHI, E. PRETSCH, W. E. MORF, W. SIMON, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 2407 (1976).
9. W. E. MORF, D. AMMANN, W. SIMON, *Chimia*, **28**, 65 (1974).
10. W. E. MORF, W. SIMON, in „Ion Selective Electrodes in Analytical Chemistry”, H. Freiser (ed.), Plenum Press, New York, 1978.
11. U. OESCH, W. SIMON, *Helv. Chim. Acta*, **62**, 754 (1979).
12. J. KORYTA, *Ion Selective Electrodes*, Cambridge University Press, 1975.
13. G. N. LEWIS, M. RANDALL, *Thermodynamics*, McGraw-Hill, New York, 1961.
14. P. SCHUSTER, W. JAKUBETZ, W. MARIUS, *Topics in Current Chemistry*, **60**, 1 (1975).
15. P. HOBZA, R. ZAHRADNIK, *Weak Intermolecular Interactions in Chemistry and Biology*, Elsevier, Amsterdam, 1980.
16. W. SIMON, W. E. MORF, D. AMMANN, in „Calcium Binding Proteins and Calcium Function”, p. 50, R. H. Wasserman et al. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1977.
17. W. E. MORF, W. SIMON, *Helv. Chim. Acta*, **54**, 794 (1971).
18. W. E. MORF, W. SIMON, *Helv. Chim. Acta*, **54**, 2683 (1971).
19. E. SCROCCO, J. TOMASI, *Topics in Current Chemistry*, **42**, 95 (1973).
20. P. SCHUSTER in „Intermolecular Interactions: From Diatomics to Biopolymers”, p. 363, B. Pullman (Ed.), Wiley, New York, 1978.
21. N. GRESH, P. CLAVERIE, A. PULLMAN, *Int. J. Quantum Chem. Symp.*, **13**, 243 (1979).
22. M. PERRICAUDET, A. PULLMAN, *FEBS Letters*, **34**, 222 (1973).
23. A. M. ARMBRUSTER, A. PULLMAN, *FEBS Letters*, **49**, 18 (1974).
24. A. PULLMAN, P. SCHUSTER, *Chem. Phys. Letters*, **24**, 472 (1974).

25. A. PULLMAN, C. GIESSNER PRETTE, YU. V. KRUGLYAK, *Chem. Phys. Letters*, **35**, 156 (1975).
26. J. F. HINTON, A. BEELER, D. HARPOOL, R. W. BRIGGS, A. PULLMAN, *Chem. Phys. Letters*, **47**, 411 (1977).
27. D. PERAHIA, A. PULLMAN, B. PULLMAN, *Theor. Chim. Acta*, **42**, 23 (1976); **43**, 207 (1977).
28. A. PULLMAN, H. BERTHOD, N. GRESH, *Int. J. Quantum Chem. Symp.*, **10**, 59 (1976).
29. D. DEMOULIN, A. PULLMAN, *Theor. Chim. Acta*, **49**, 161 (1978).
30. B. PULLMAN, N. GRESH, H. BERTHOD, A. PULLMAN, *Theor. Chim. Acta*, **44**, 151 (1977).
31. B. PULLMAN, A. GOLDBLUM, H. BERTHOD, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1166 (1977).
32. B. M. RODE, TH. PONTANI, *Monatshefte für Chemie*, **109**, 871 (1978); H. G. KRAFT, B. RODE, *Monatshefte für Chemie*, **111**, 797 (1980).
33. E. CLEMENTI, *J. Chem. Phys.*, **46**, 3851 (1967).
34. W. KOLOS, *Theor. Chim. Acta*, **51**, 219 (1979); **54**, 187 (1980).
35. L. GIANOLIO, R. PAVANI, E. CLEMENTI, *Gazz. Chim. Ital.*, **108**, 181 (1978).
36. L. GIANOLIO, E. CLEMENTI, *Gazz. Chim. Ital.*, **110**, 179 (1980).
37. R. P. SCHOLER, W. SIMON, *Chimia*, **24**, 372 (1970).
38. B. T. KILBOURN, J. D. DUNITZ, L. A. R. PIODA, W. SIMON, *J. Mol. Biol.*, **30**, 559 (1967).
39. E. PRETSCH, M. VASAK, W. SIMON, *Helv. Chim. Acta*, **55**, 1098 (1972).
40. Y. NAWATA, T. SAKAMAKI, Y. IITAKA, *Chem. Lett. Tokyo*, 151 (1975); *Acta Cryst.*, **B33**, 1201 (1977).
41. K. NEUPERT-LAVES, M. DOBLER, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 614 (1976).
42. P. PORTMANN, E. PRETSCH, E. CLEMENTI, W. SIMON, előkészületben.
43. J. D. PAYZANT, A. J. CUNNINGHAM, P. KEBARLE, *Can. J. Chem.*, **51**, 3242 (1973).
44. B. METZ, J. M. ROSALKY, R. WEISS, *JCS Chem. Comm.*, 533 (1976).
45. H. UMEYAMA, T. NOMOTO, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2504 (1979).
46. E. CLEMENTI, *Lecture Notes in Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, Vol. 2, 1976; Vol. 19, 1980.
47. G. CORONGIU, E. CLEMENTI, E. PRETSCH, W. SIMON, *J. Chem. Phys.*, **70**, 1266 (1979).
48. G. CORONGIU, E. CLEMENTI, E. PRETSCH, W. SIMON, *J. Chem. Phys.*, **72**, 3096 (1980).
49. E. PRETSCH, G. CORONGIU, E. CLEMENTI, A. NESZMÉLYI, W. SIMON, előkészületben.
50. J. D. DUNITZ, P. SEILER, *Acta Cryst.*, **B30**, 2739 (1974).
51. M. J. BOVILL, D. J. CHADWICK, I. O. SUTHERLAND, D. J. WATKIN, *J. Chem. Soc. Perkin II*, 1529 (1980).
52. M. DOBLER, J. D. DUNITZ, P. SEILER, *Acta Cryst.*, **B30**, 2741 (1974).
53. P. SEILER, M. DOBLER, J. D. DUNITZ, *Acta Cryst.*, **B30**, 2744 (1974).
54. M. WELTI, E. PRETSCH, E. CLEMENTI, W. SIMON, előkészületben.

## HIPOTALAMUSZ HORMONOK SZTEREOKÉMIÁJA ÉS BIOLÓGIAI HATÁSA

WOLFGANG VOELTER,\* NADARAJAH VETHARIYASAR\*\*

(\*Abteilung für Organische und Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts  
der Universität Tübingen, D-7400 Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 1.)

(\*\*Department of Chemistry, University of Calabar, P.M.B. 1115, Calabar, Nigeria)

### Bevezetés

A hipotalamusz releasing hormonok nevét, szerkezetét, amennyiben ismertek, és biológiai hatásukat az 1. táblázat, a hipotalamusz inhibeáló hormonok megfelelő adatait a 2. táblázat tartalmazza. Az első hormon, amit hipotalamusz fragmensekből izoláltak a TRH [1—3] volt, amit az LH/FSH—RH [4—6] és a szomatostatint követett [7, 8]. Felfedezésük óta ezt a három peptidhormont számos klinikai [9], szintetikus [10] és szerkezetvizsgálatnak [11] vetették alá.

### *Tirotropin-releasing hormon*

A TRH (1. ábra) izolálása és szerkezetfelderítése után több peptid-laboratórium fejlesztett ki szintetikus módszereket az eddig ismert legkisebb peptidhormon és származékainak előállítására [10]. Példaként itt a KURATH és THOMAS [12] (2. ábra) által kidolgozott szintézist említjük meg. Az aminosavak kapcsolása hidroxiszukcinimid észtereken át történt.

A Z-L-pirolglutamil-L-hisztidil-L-prolinamid hidrogénezése kvantitatíve TRH-t eredményez, viszont a Z-L-Pyr-L-His-L-Pro-NH<sub>2</sub> védett tripeptidet nem szabad metanolból átkristályosítani, mivel metanolízis következtében a Z-L-(O<sup>5</sup>-metil)-glutamil-L-hisztidil-L-prolinamid képződik. Néhány szintézis, amelyek a TRH vagy származékainak előállítását célozzák, azon reakción alapszanak, melyet KÖNIG és GEIGER [13] fedeztek fel: N'-4,4'-dimetoxi-benzhidril-L-glutamir pirolglutaminsavvá alakul forró trifluorecetsavban. A mi D-His<sup>2</sup>-TRH szintézisünk ezt a felfedezést hasznosítja [14] (3. ábra).

Annak érdekében, hogy a szerkezet-hatás összefüggéseket kiértékelhessük a TRH származékok szintézise lényeges. A 3. táblázatban néhány *di*-, *tri*- és tetrapeptid TSH-releasing aktivitása található. A 3. táblázat adataiból látszik, hogy a pirolglutamil csoport helyettesítése általában csökkenti a biológiai aktivitást, viszont újabb vizsgálatok azt igazolták, hogy a O=C—NH—C—C=O szerkezeti része a pirolglutamil csoportnak már elegendő némi biológiai hatás fellépéséhez [25, 26]. Az egyik legmeglepőbb hatás az, hogy az (1-Me-His<sup>2</sup>)-TRH nagyon kis biológiai hatást



1. táblázat

*A hipotalamusz hormonok neve (rövidítésekkel), szerkezete és biológiai hatásuk*

Hormon	Szerkezet (javasolt)	Szabályozó effektus
Kortikotropin releasing hormon (CRH)	Ac-Ser-Tyr-Cys-Phe-His-(Asn, Gln)-   -Cys-(Pro, Val)-Lys-Gly-NH <sub>2</sub>	ACTH* termelés
Sárgatest stimuláló (FSH-RH) hormon-releasing hormon	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro- -Gly-NH <sub>2</sub>	FSH* termelés
Luteinizáló hormon-releasing hormon (LH-RH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg- -Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	LH* termelés
Melanocita stimuláló hormon-releasing hormon (MRH)	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn	MSH* termelés
Prolaktin-releasing hormon (PRH)		PRL* termelés
Tirotropin-releasing hormon (TRH)	Pyr-His-Pro-NH <sub>2</sub>	TSH* termelés
Növekedési hormon-releasing hormon (GHR)	Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys- -Glu-Ala (nem igazolt) Pyr-Ser-Gly-NH <sub>2</sub>	GH* termelés

\* A rövidítéseket lásd a 2. táblázatban.

2. táblázat

*A hipotalamusz-inhibeáló hormonok neve (rövidítésekkel) szerkezete és biológiai hatása*

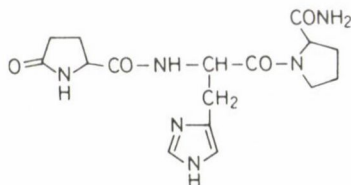
Hormon	Szerkezet (javasolt)	Szabályozó effektus
Melanocita stimuláló hormon release-inhibeáló hormon (MRIH)	Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Pro-His-Phe-Arg-Gly-NH <sub>2</sub> Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-OH	MSH* release elnyomása
Prolaktin-release inhibeáló hormon (PIH)		PRL* release elnyomása
Növekedési hormon-release inhibeáló hormon (GIH)	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH	GH* release elnyomása

\* Az 1. és 2. táblázatban használt jelölések.

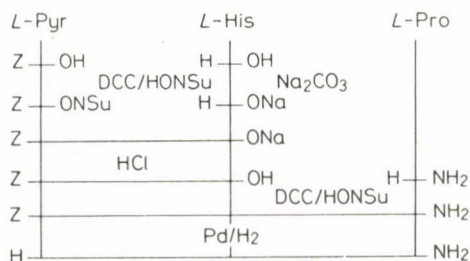
ACTH: adrenokortikotrop hormon; FSH: sárgatest stimuláló hormon; GH: növekedési hormon (szomatotropin); LH: luteinizáló hormon; MSH: melanocita stimuláló hormon; PRL: prolaktin; TSH: tirotropin (tiroid-stimuláló hormon).

mutat a (3-Me-His<sup>2</sup>)-TRH hatásához képest (l. 3. táblázat), ami valószínűleg az imidazol gyűrű csökkent pK értékének tudható be. Sztérikus hatások és/vagy az aromás szénatomok elektronsűrűségeinek változásai tehetők felelőssé a Tyr<sup>2</sup>-TRH és Tyr(OMe)<sup>2</sup>-TRH alacsony aktivitásáért a Phe<sup>2</sup>-TRH hatásához viszonyítva. Amint a Met<sup>2</sup>-TRH biológiai aktivitása mutatja a TSH release hatást okozhatják peptidek,

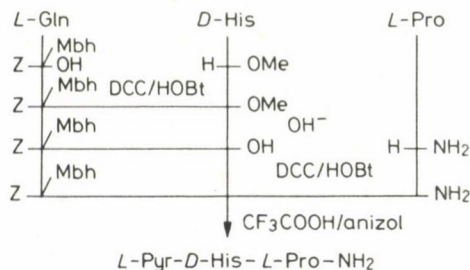
melyek a 2-es pozícióban sem aromás sem heteroaromás aminosavmaradékot nem tartalmaznak. Ha a prolin egyik amid protonját alkil csoporttal helyettesítjük, akkor olyan tripeptid származékot nyerhetünk, melyek TSH-release hatása akár magasabb is lehet, mint a TRH hatása, amint ezt az L-Pyr-L-His-L-Pro-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub> demonstrálja [9, 27–31].



1. ábra. A TRH szerkezete (L-piroglutamil-L-hisztidil-L-prolinamid)



2. ábra. KURATH és THOMAS [12] TRH szintézise

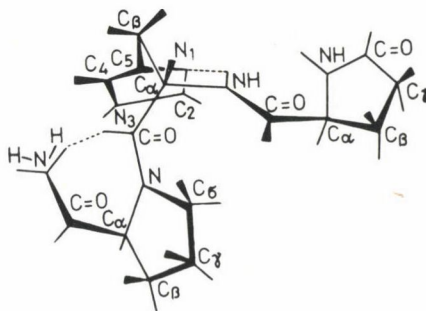


3. ábra. CF<sub>3</sub>COOH/anizol. VOELTER és munkatársai D-His<sup>2</sup>-TRH szintézise [14]

A TRH-t és származékait részletesen vizsgálták infravörös, tömeg, térdeszorpciós tömeg [32], proton és szén-13 NMR spektroszkópiával. Áttekintést ezekről a vizsgálatokról a [10, 11] irodalmi hivatkozások adnak. A TRH egyik legelső szerkezeti modelljét proton NMR vizsgálattal nyerték (4. ábra) [33]. A C-terminális transz amid proton jele erősen az alacsony térerős felé tolódott el, ami ezért a hisztidil karbonil csoportjával képzett hidrogénhidás kötést valószínűsíti.

$^{13}\text{C}$ -NMR vizsgálatok egyértelműen igazolták, hogy a TRH vizes oldatban cisz és transz izomerek elegyéből áll (5. ábra). A prolin csoport szénatomjai két jelet mutatnak a TRH  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumában (6. ábra) [10].

Megfelelő kristályok hiányában sem a TRH-nak, sem származékainak nem tudták meghatározni a kristályszerkezetét jó ideig. Ezen a téren az első röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározás a Phe<sup>2</sup>-TRH [35] esetében írták le, az eredmény a 7. ábrán



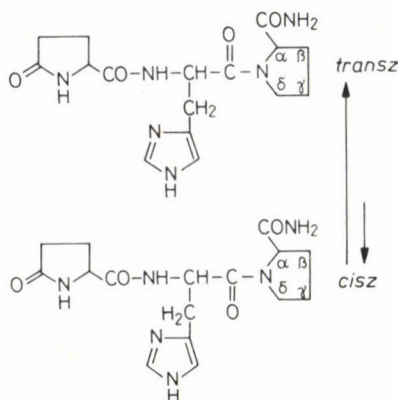
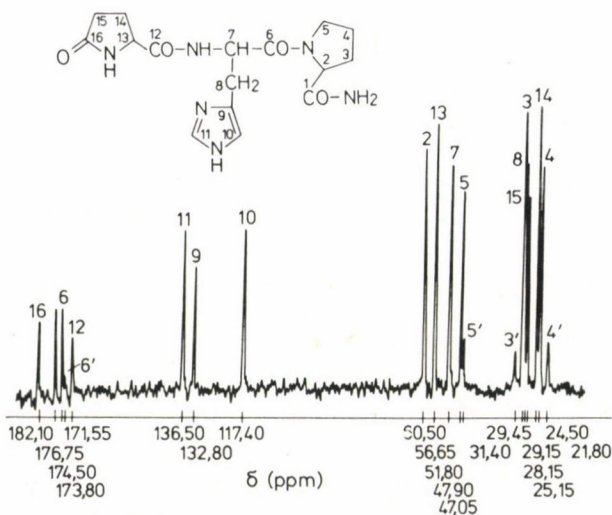
4. ábra. A TRH modellje  $^1\text{H}$ -NMR vizsgálatok alapján [33]

### 3. táblázat

Néhány di-, tri- és tetrapeptid (származék) TSH-release hatása TRH-hoz viszonyítva, mint 100%

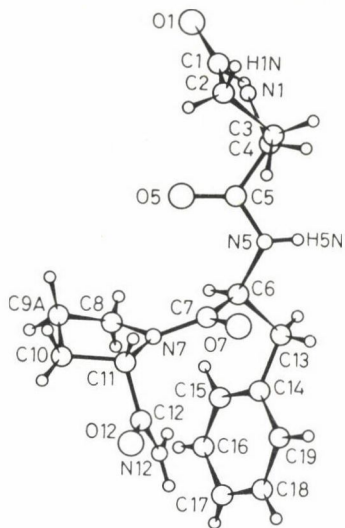
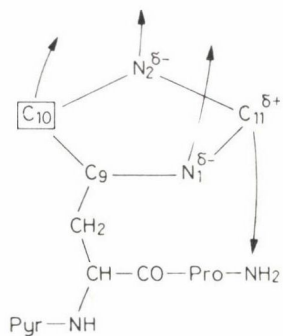
Vegyület	TRH-hoz viszonyított aktivitás = 100%	Irodalom
L-Glu-L-His-L-Pro-OH	inaktív	[3]
$\gamma$ -L-Glu-L-His-L-Pro-OH	inaktív	[15]
L-His-L- $\gamma$ -Glu-L-Pro-OH	inaktív	[16]
L-His-L-Pro-L-Glu-OH	inaktív	[15]
L-Pro-L-His-L-Pro-NH <sub>2</sub>	0,01	[17, 18]
L-Pyr-L-Arg-L-Pro-NH <sub>2</sub>	0,05	[17]
L-Pyr-1-Me-L-His-OMe	0,01	[19]
L-Pyr-1-Me-L-His-L-Pro-NH <sub>2</sub>	0,1	[19]
L-Pyr-3-Me-L-His-L-Pro-NH <sub>2</sub>	800	[19]
L-Pyr-L-His-OMe	<0,001	[19]
L-Pyr-L-His-L-Ala-NH <sub>2</sub>	<0,09	[20]
L-Pyr-L-His-L-Ile-NH <sub>2</sub>	inaktív	[20]
L-Pyr-L-His-L-Met-NH <sub>2</sub>	inaktív	[20]
L-Pyr-D-His-L-Pro-NH <sub>2</sub>	inaktív	[21]
L-Pyr-L-His-L-Pro-OMe	9	[20]
L-Pyr(Me)-L-His-L-Pro-NH <sub>2</sub>	1,7	[17, 18]
L-Pyr-L-His-L-Pro-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	14	[17, 18]
L-Pyr-L-His-L-Pro-L-Ala-NH <sub>2</sub>	0,5	[17, 18]
L-Pyr-L-His-L-Pro-Gly-H <sub>2</sub>	35	[17, 18]
L-Pyr-L-Met-L-Pro-NH <sub>2</sub>	1	[17]
L-Pyr-L-Phe-L-Pro-NH <sub>2</sub>	<10	[22]
L-Pyr-L-Tyr-L-Pro-NH <sub>2</sub>	0,08	[23]
L-Pyr-L-Tyr(OMe)-L-Pro-NH <sub>2</sub>	inaktív	[24]



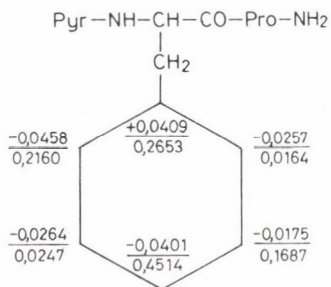
5. ábra. A TRH *cis*-*trans* izomériája [10]6. ábra. A TRH 22,63 MHz-es pulse Fourier  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spektruma (200 mg 1,5 ml  $\text{D}_2\text{O}$ -ban); 30 °C; pulzushossz 10  $\mu\text{s}$ ; pulzus intervallum 0,4 s/4 k interferogram, 16 384 akkumulált interferogram [34]

látható. Időközben a TRH [35] és a  $\text{Thi}^2\text{-TRH}$  [37] kristályszerkezetét is meghatározták és mindegyik hasonló konformációjúnak bizonyult.

Egy közelmúltban végzett vizsgálatban a TRH legalacsonyabb energiájú konformációját hasonlították össze az  $(1\text{-Me-His})^2\text{-TRH}$  és  $(3\text{-Me-His})^2\text{-TRH}$  konformációjával és nem találtak lényeges különbséget a térbeli szögekben. Mind a 3 peptidben a két gyűrű nitrogénen jelentős negatív töltés van, a C-11 pozitív töltésű, ebből arra következtettek, hogy a két negatív nitrogén atom segíthet a gyűrűnek, hogy közel kerülhessen a receptor elektronakceptor centrumához (8. ábra) [38].

7. ábra. A Phe<sup>2</sup>-TRH kristályszerkezete [35]

8. ábra. A TRH lehetséges közeledése receptorának pozitív centrumához

9. ábra. A Phe<sup>2</sup>-TRH aromás részének elektron töltés eloszlása (aláhúzott számok) és frontális elektron-sűrűsége

4. táblázat

Összefüggés a biológiai hatás és az aromás rész orto szénatomjainak frontális elektronsűrűsége ( $f.e.d.C_{orto}$ ) között a TRH-ra és analógjaira

	(1-Me-His) <sup>2</sup> -TRH	Phe <sup>2</sup> -TRH	TRH	(3-Me-His <sup>2</sup> )-TRH
Biológiai aktivitás (%)	0,04	10	100	800
$f.e.d.C_{orto}$	0,0010	0,2160	0,3440	0,6676

A Phe<sup>2</sup>-TRH orto helyzetű szénatomjának van a legnagyobb negatív töltése és ezért alkalmas arra, hogy megtámadja az elektronakceptor centrumot (9. ábra) [38].

Emellett egész jó korreláció van a biológiai aktivitás és az aromás, ill. heteroaromás orto szének elektronsűrűsége között a TRH és analógjai esetében (4. táblázat) [38].

#### Luteinizáló hormon/sárgatest stimuláló hormon-releasing hormon

Szerkezetigazolásuk után több rögtön különböző csoportok dolgoztak az LH/FSH-RH és származékainak totál szintézisén [9–11]. Az LH/FSH-RH és származékainak szerkezet-hatás összefüggéséről ad áttekintést az 5. táblázat. Az L-Pyr-L-Tyr-L-Arg-L-Trp-NH<sub>2</sub> FSH-releasing aktivitására (0,013%) a tirozin és arginin csoportok jelenléte ad valószínű magyarázatot. Az erős aktivitásvesztést a (Des-Leu<sup>7</sup>)-LH-RH-ban a természetes hormonhoz viszonyítva az ionos mechanizmus megzavarása okozhatja, melyet az arginin csoport új környezete magyaráz. A (Des-Gly-NH<sub>2</sub><sup>10</sup>,Pro-etilamid<sup>9</sup>)-LH-RH többszörös aktivitást mutat, mint a természetes hormon és ezért ez az egyik legérdekesebb eddig ismert LH/FSH-RH származék.

5. táblázat

Peptidek és származékaik LH és FSH releasing aktivitása  
(LH/RH = 100%-ra vonatkoztatva [11])

Vegyület	Aktivitás LH/FSH-RH = 100%-hoz viszonyítva
(Ac-L-Ala <sup>1</sup> )-LH/FSH-RH	~0,25(LH); 0,1–0,25 FSH
(L-Ala <sup>3</sup> )-LH/FSH-RH	<0,001
(L-Ala <sup>4</sup> )-LH/FSH-RH	5
(L-Ala <sup>4</sup> )-LH/FSH-RH	kis aktivitás
(L-Ala <sup>4</sup> )-LH/FSH-RH	3–6(LH); 16(FSH)
(L-Ala <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	kis aktivitás
(L-Ala <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	1
(D-Ala <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	~200
(D-Ala <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	570(LH); 475(FSH)
(D-Ala <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	570(LH); 475(FSH)
(D-Ala <sup>6</sup> ,Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH etilamid	200



Vegyület	Aktivitás LH/FSH-RH = 100%-hoz viszonyítva
(L-Ala <sup>7</sup> )-LH/FSH-RH	5–6(LH); 3–5(FSH)
(L-Ala <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	0,85
(L-Ala <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	10(LH)
(L-Ala <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	6,0(LH); 3,5(FSH)
(L-Ala <sup>4</sup> ,L-Phe <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	kis aktivitás
(L-Ala <sup>4</sup> ,L-Phe <sup>5</sup> ,L-Lys <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	kis aktivitás
(L-Pyr(I)-Ala <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	1
(L-Arg <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	< 0,1(LH); 0,1(FSH)
(L-Arg <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	≈ 0,03(LH); 0,01(FSH)
(L-Arg <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	0,005
(D-Arg <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	> 0,05 > 0,5
Ac-L-Arg-L-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	< 0,001 (in vitro)
(L-Cit <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	6–33
(L-Cit <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	7,5 (in vivo)
(L-Cha <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	22,4 (in vivo)
(Dab <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	2 (in vivo)
Des-(L-Arg <sup>8</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	< 0,01
(Des-L-Arg <sup>8</sup> -L-Pro <sup>9</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	inaktív
(Des-Gly <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	~ 5(LH); 5–7 (FSH)
(Des-Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	11(LH)
(Des-Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	11
Des-(Gly <sup>6</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	< 0,01
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-OEt <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	11,5(LH); 6,4(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-NH <sub>2</sub> <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	< 5(LH); 3(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-n-butilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	7,2(LH); 4,3(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-ciklohexilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	0,7(LH); 0,6(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-dimetilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	15(LH); 9(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etanolamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	100–150
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etanolamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	210(LH); 220(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	500
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	120(LH); 158(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	500
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	300(LH); 280(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	550(LH); 700(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	300(LH); 280(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	300(LH); 280(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	erős aktivitás
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,L-Ala <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	22(LH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Ala <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	180(LH); 300(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Ala <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	180(LH); 300(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,α-aminoizovajsav <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	470(LH); 300(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Ala <sup>6</sup> ,L-Phe <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	270(LH); 300(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Ala <sup>6</sup> ,L-Phe <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	270(LH); 300(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Ala <sup>6</sup> ,L-Ile <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	160(LH); 350(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Ala <sup>6</sup> ,L-Ile <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	160(LH); 350(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Abu <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	180(LH); 170(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Nva <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	90–400(LH); 160–290(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Leu <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	275(LH); 280(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Leu <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	5360(LH); 1450(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Leu <sup>6</sup> )-L-Phe <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	100(LH); 90(FSH)

Vegyület	Aktivitás LH/FSH-RH = 100%-hoz viszonyítva
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Leu <sup>6</sup> ,L-Ile <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	85(LH); 67(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Phe <sup>6</sup> ,L-Phe <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	140(LH); 120 – 520(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-etilamid <sup>9</sup> ,D-Ser <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	100(LH); 100(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-izobutilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	3(LH); 2,8(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-izopropilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	150(LH); 100(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-metilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	80 – 100
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-metilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	47(LH); 56(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-OMe <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	6,2(LH); 2,9(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-morfolinamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	20 – 30
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-morfolinamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	17(LH); 16(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-piperidinamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	1,5(LH); 2,0(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-propilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	200 – 300
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-propilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	550(LH); 940(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-propilamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	190(LH); 210(FSH)
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-pirrolidinamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	70 – 80
(Des-Gly-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ,L-Pro-pirrolidinamid <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	110(LH); 92(FSH)
(Des-His <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	<0,001
(Des-His <sup>2</sup> )-LH-FSH-RH	0,001
(Des-L-His <sup>2</sup> ,Des-L-Pro <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	≤0,1(LH); ≤0,1(FSH)
Des-(L-His <sup>2</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	<0,01
(Des-L-Leu <sup>7</sup> -L-Arg <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	inaktív
Des-(L-Leu <sup>7</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	<0,01
(Des-L-Leu <sup>7</sup> -L-Arg <sup>8</sup> -L-Pro <sup>9</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
Des-(L-Pro <sup>9</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	<0,01
(Des-L-Pro <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	~ 1(LH); 0,8(FSH)
(L-Pro <sup>1</sup> )-LH/FSH-RH	0,02(LH); <0,5(FSH)
(D-Pyr <sup>1</sup> )-LH/FSH-RH	~ 1(LH); 0,6(FSH)
(Des-L-Pyr <sup>1</sup> )-LH/FSH-RH	<0,002
(Des-L-Pyr <sup>1</sup> -Des-L-His <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	inaktív
Des-(L-Ser <sup>4</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	<0,01
Des-(L-Trp <sup>3</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	<0,01
(5-F-L-Trp <sup>3</sup> )-LH/FSH-RH	6
Des-(L-Tyr <sup>5</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	<0,01
(L-Glu <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Gln <sup>4</sup> )-LH/FSH-RH	8(LH); 6(FSH)
Ac-Gly-L-Leu-L-Arg-L-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	<0,001 (in vitro)
(Ac-Gly <sup>1</sup> )-LH/FSH-RH	>0,25(LH); 0,1 – 0,5(FSH)
(Gly <sup>3</sup> )-LH/FSH-RH	<0,001
(Gly <sup>4</sup> )-LH/FSH-RH	1,5
(Gly <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	0,1
(Gly <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	0,1 (in vivo)
(Gly <sup>7</sup> )-LH/FSH-RH	3(LH); 5(FSH)
(Gly <sup>7</sup> )-LH/FSH-RH	0,2
(Gly <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	0,1
(Gly <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	0,2
(Gly-NHCH <sub>3</sub> <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	1,7(LH); 1,9(FSH)
[Gly-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> ]-LH/FSH-RH	inaktív
(Gly-NMe <sub>2</sub> <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	14
(Gly-OH <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	0,5(LH); 0,5(FSH)
(Gly-OCH <sub>3</sub> <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	1,4(LH); 1,0(FSH)
(Gly <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	0,003(LH); 0,003(FSH)

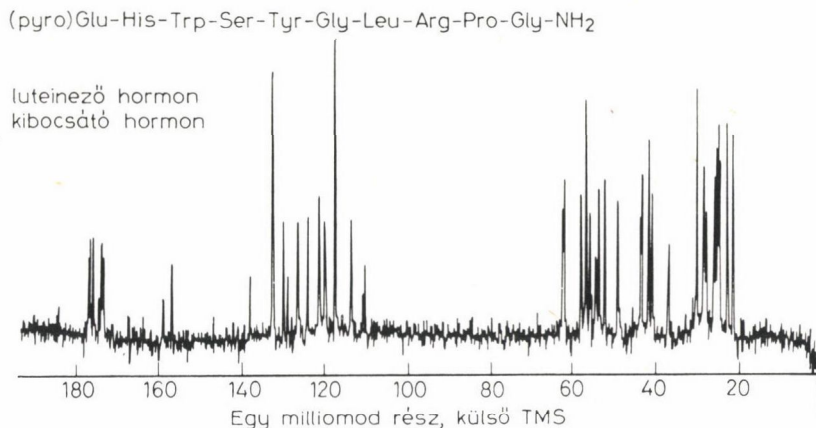
Vegyület	Aktivitás LH/FSH-RH = 100%-hoz viszonyítva
(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -C-Gly <sup>1</sup> )-LH/FSH-RH	0,2
(Gly <sup>10</sup> ,Gly <sup>2a</sup> )-LH/FSH-RH	0,003(LH); 0,003(FSH)
(Gly <sup>10</sup> ,Gly <sup>1a</sup> )-LH/FSH-RH	<0,003(LH); <0,0003(FSH)
(Gly <sup>10</sup> ,L-Tyr <sup>3</sup> ,L-Trp <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	0,0003(LH); 0,00015(ESH)
(L-Har <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	25 – 50
(L-Har <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	21,7
(L-Har <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	12,6 (in vivo)
Ac-L-His-L-Trp-L-Ser-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Arg-L-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	0,2
Ac-L-His-L-Trp-L-Ser-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Arg-L-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	0,2 (in vitro)
(L-His <sup>3</sup> )-LH/FSH/RH	<0,05
(D-His <sup>2</sup> )-LH/FSH/RH	10,0
(3-Me-L-His <sup>2</sup> )-LH/FSH/RH	1(LH); 1 – 2(FSH)
(N <sup>ε</sup> -Me-L-His <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	6
(N <sup>ε</sup> -Me-L-His <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	2
(L-Ile <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	0,03
(L-Ile <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	0,034
(L-Ile <sup>7</sup> )-LH/FSH-RH	45(LH); 33(FSH)
L-Leu-L-Arg-L-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	inaktív
Ac-L-Leu-L-Arg-L-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	<0,001 (in vitro)
(L-Leu <sup>1</sup> )-LH/FSH-RH	0,003
(L-Leu <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	0,5
(D-Leu <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	>0,01, <0,05
(L-Leu <sup>2,3</sup> )-LH/FSH/RH	inaktív
(L-Leu <sup>4</sup> )-LH/FSH-RH	inaktív
(D-Leu <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	110(LH); 100(FSH)
(D-Leu <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	900(LH); 500(FSH)
(L-Leu <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	<1
(L-Lys <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	<0,1(LH); <0,1(FSH)
(L-Lys <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	jelentékeny aktivitás
(L-Lys <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	10 – 30
(L-Lys <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	7,6
(L-Lys <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	11 – 28(LH); 25(FSH)
(L-Lys <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	viszonylag alacsony aktivitás
(L-Lys <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Lys <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	6,0 (in vivo)
(Nar <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	15,1 (in vivo)
(L-Nle <sup>7</sup> )-LH/FSH-RH	30(LH); 22(FSH)
(L-Orn <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	6 – 12(LH); 5(FSH)
(L-Orn <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	aktív
(L-Orn <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	5,5
(L-Orn <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	2,0 (in vivo)
(N <sup>δ</sup> -Ac-L-Orn <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	5,1 (in vivo)
(N <sup>δ</sup> -Bz-L-Orn <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	1,1 (in vivo)
(L-Phe <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	4
(L-Phe <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	4 – 7(LH); 2(FSH)
(D-Phe <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	<0,001
(L-Phe <sup>3</sup> )-LH/FSH-RH	2
(L-Phe <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	≈ 50
(L-Phe <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	42,5 (in vivo)
(L-Phe <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	64
(D-Phe <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	0,0001
(D-Phe <sup>2</sup> -D-Ala <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	0,1



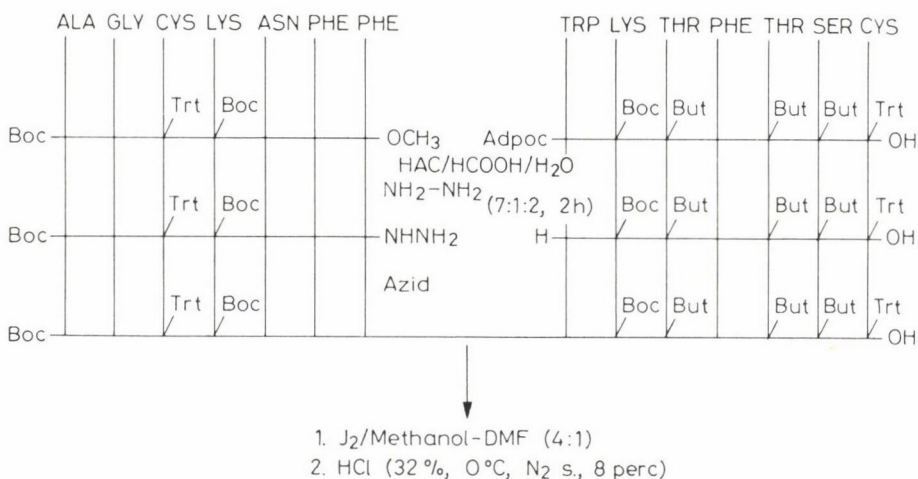
Vegyület	Aktivitás LH/FSH-RH = 100%-hoz viszonyítva
(D-Phe <sup>2</sup> -L-Leu <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	0,01
(D-Phe <sup>2</sup> -D-Arg <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	0,001
(D-Phe <sup>2</sup> -2Me-L-Ala <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	0,0001
(p-aminofenilalanin)-LH/FSH-RH	0,59
(p-aminofenilalanin)-LH/FSH-RH	37
(D,L-klórifenilalanin)-LH/FSH-RH	inaktív
(p-metoxifenilalanin)-LH/FSH-RH	24
(Pentametilfenilalanin)-LH/FSH-RH	69
(p-nitrofenilalanin)-LH/FSH-RH	0,01
(p-nitrofenilalanin)-LH/FSH-RH	5
Ac-L-Pro-Cly-NH <sub>2</sub>	<0,001 (in vitro)
(L-Pro <sup>1</sup> )-LH/FSH-RH	<0,1(LH); <0,1(FSH)
(L-Pro <sup>1</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Pro <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Pro <sup>3</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Pro <sup>4</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Pro <sup>5</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Pro <sup>6</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Pro <sup>7</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Pro <sup>8</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Pro <sup>9</sup> )-LH/FSH-RH	45
(L-Pro <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	alacsony aktivitás
(L-Pro <sup>10</sup> )-LH/FSH-RH	0,18(LH); 0,14(FSH)
(L-Pyr(3)Ala <sup>2</sup> )-LH/FSH-RH	19
L-Pyr-L-Gln-L-Ala-NH <sub>2</sub>	inaktív
L-Pyr-L-His-NH <sub>2</sub>	0,01
L-Pyr-L-His-L-Phe-L-Ala-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Arg-L-Pro-NHEt	7,5 (in vivo); 6,04 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Phe-Gly-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Arg-L-Pro-NHEt	5,1 (in vivo); 2,81 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Phe-L-Ala-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Lys-L-Pro-NHEt	0,6 (in vivo); 0,12 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Phe-Gly-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Lys-L-Pro-NHEt	0,091 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Phe-Gly-L-Tyr-Gly-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Har-L-Pro-NHEt	0,0013 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Phe-L-Ala-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Har-L-Pro-NHEt	0,0019 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Phe-L-Ala-L-Tyr-Gly-L-Phe-L-Arg-L-Pro-NHEt	8,1 (in vivo); 1,59 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Phe-L-Ala-L-Tyr-D-Ala-L-Leu-L-Arg-L-Pro-NHEt	28,3 (in vivo); 2,13 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Phe-D-Ala-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Arg-L-Pro-NHEt	0,3 (in vivo); 0,24 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Phe-Gly-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Arg-L-Pro-AMT-Me	1,5 (in vivo); 1,18 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-L-Pro-NH <sub>2</sub> (TRH)	inaktív
L-Pyr-L-His-L-Ser-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Arg-L-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	<0,001 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Trp-NH <sub>2</sub>	0,1
L-Pyr-L-His-L-Trp-NH <sub>2</sub>	inaktív
L-Pyr-L-His-L-Trp-OH	inaktív
L-Pyr-L-His-L-Trp-OH	<0,0003(LH); <0,003(FSH)
L-Pyr-L-His-L-Trp-OH	alacsony aktivitás
L-Pyr-L-His-L-Trp-OH	1
L-Pyr-L-His-L-Trp-L-Ser-NH <sub>2</sub>	<0,01
L-Pyr-L-His-L-Trp-L-Ser-NH <sub>2</sub>	inaktív
L-Pyr-L-His-L-Trp-L-Ser-Gly-L-Leu-L-Arg-L-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	<0,001 (in vitro)
L-Pyr-L-His-L-Trp-L-Ser-L-Tyr-NH <sub>2</sub>	0,02
L-Pyr-L-His-L-Trp-L-Ser-L-Tyr-Gly-NH <sub>2</sub>	<0,01
L-Pyr-L-His-L-Trp-L-Ser-L-Tyr-Gly-OH	<0,0003(LH); <0,0003(FSH)

Az LH/FSH-RH  $^1\text{H}$ - és  $^{13}\text{C}$ -NMR vizsgálatából arra az eredményre jutottak, hogy vizes oldatban a hormon rendezetlen konformációjú [39, 40].

A 10. ábrán látható az LH/FSH-RH\*\*  $^{13}\text{C}$ -NMR spektruma. Cirkuláris dik-roizmus vizsgálatok szintén megerősítették, hogy legalábbis pH 7 alatt az LH/FSH-RH rendezetlen konformációjú.



10. ábra. Luteinizáló hormon releasing hormon, ppm külső TMS-hez viszonyítva. Az LH(FSH-RH) 50 mg/ml D<sub>2</sub>O) pulse Fourier  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spektruma; 37 °C, 158 192 akumulált interferogram, hasonlóan a [40]-es irodalmi hivatkozásban leírtakhoz



11. ábra. 1. J<sub>2</sub> (Metanol-DMF); 2. HCl (32%, 0 °C N<sub>2</sub> s, 8 perc). A szomatostatint szintézise 7 + 7 fragmens kondenzációval Adpoc védőcsoport alkalmazásával

*Szomatosztatin*

A TRH-hoz és az LH/FSH-RH-hoz képest izolálása és szerkezetmeghatározása nehezebb volt [7, 8]. Mind ez ideig csak néhány totál szintézist írtak le erre a peptid hormonra [42—46]. A szintézist, a nemrég kifejlesztett 1-(1-adamantil)-1-metil etoxikarbonil védőcsoportot (Adpoc, [46]) alkalmazva, mely nagyon kedvezően, enyhe acidolízissel hasítható, a 11. ábrán mutatjuk be [47].

$^1\text{H}$ - és  $^{13}\text{C}$ -NMR vizsgálatok alapján [48] úgy tűnik, hogy a natív szomatosztatin vizes oldatban konformációs egyensúlyban van néhány alacsony energiájú korformerrel. CD spektroszkópiai vizsgálatok arra utalnak, hogy egy rendezett szekunder struktúra tételezhető fel [49].

**Összefoglalás**

Áttekintést adunk különböző hipotalamusz hormonokról. Röviden ismertetjük a hormonokhoz vezető szintetikus utakat, megemlítve az újabban felfedezett védőcsoport, az 1-(1-adamantil)-1-metiloxikarbonil (Adpoc) előnyeit. A hipotalamusz hormonok különböző spektroszkópiai vizsgálatának eredményeit összehasonlítjuk.

**Summary**

A survey of the different hypothalamic hormones is given. Briefly some synthetic routes to the hormones are discussed mentioning also the advantages of a recently discovered protecting group, the 1-(1-adamantyl)-1-methyloxycarbonyl (Adpoc) group. The results of spectroscopic investigations with different methods on hypothalamic hormones are compared with each other.

**IRODALOM**

1. A. V. SCHALLY, C. Y. BOWERS, T. W. REDDING, J. F. BARRETT, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 165 (1966).
2. R. BURGUS, R. GUILLEMIN, in J. MEITES (ed.): *Hypophysiotropic Hormones of the Hypothalamus: Assay and Chemistry*, p. 227, Williams & Wilkins, Baltimore (1970).
3. A. V. SCHALLY, T. W. REDDING, C. Y. BOWERS, J. F. BARRETT, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4077 (1969).
4. A. V. SCHALLY, A. ARIMURA, Y. BABA, R. M. G. NAIR, H. MATSUO, T. W. REDDING, L. DEBELJUK, W. F. WHITE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 393 (1971).
5. M. AMOSS, R. BURGUS, R. BLACKWELL, W. VALE, R. FELLOWS, R. GUILLEMIN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 205 (1971).
6. H. MATSUO, Y. BABA, R. M. NAIR, A. ARIMURA, A. V. SCHALLY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1334 (1971).
7. P. BRAZEAU, W. VALE, R. BURGUS, N. LING, M. BUTCHER, J. RIVIER, R. GUILLEMIN, *Science*, **179**, 77 (1973).
8. R. BURGUS, N. LING, M. BUTCHER, R. GUILLEMIN, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, 684 (1973).
9. D. GUPTA, W. VOELTER, *Hypothalamic Hormones — Chemistry, Physiology and Clinical Applications*, Verlag Chemie, Weinheim, New York (1978).
10. D. GUPTA, W. VOELTER, *Hypothalamic Hormones — Structure, Synthesis and Biological Activity*, Verlag Chemie, Weinheim (1975).
11. W. VOELTER, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, **34**, 439 (1977).
12. P. KURATH, A. M. THOMAS, *Helv. Chim. Acta*, **56**, 1656 (1973).
13. W. KÖNIG, R. GEIGER, *Chem. Ber.*, **105**, 2872 (1972).
14. W. VOELTER, S. FUCHS, K. ZECH, *Tetrahedron Letters*, **1974**, 3975.



15. R. BURGUS, T. F. DUNN, D. M. DESIDERIO, D. N. WARD, W. VALE, R. GUILLEMIN, A. M. FELIX, D. GILLESSEN, R. O. SUDER, *Endocrinology*, **86**, 573 (1970).
16. D. GILLESSEN, A. M. FELIX, W. LERGIER, R. O. STUDER, *Helv. Chim. Acta*, **53**, 63 (1970).
17. M. MONAHAN, J. RIVIER, W. VALE, N. LING, G. GRANT, M. AMOSS, R. GUILLEMIN, R. BURGUS, E. NICOLAIDES, M. REBSTOCK, 3rd American Peptide Symposium (1972).
18. W. VALE, G. GRANT, R. GUILLEMIN, in W. F. Ganong and L. Martini (eds): *Frontiers in Neuroendocrinology*, p. 375, Oxford Univ. Press, New York (1973).
19. J. RIVIER, W. VALE, M. MONAHAN, N. LING, R. BURGUS, *J. Med. Chem.*, **15**, 479 (1972).
20. J.-K. CHANG, H. SIEVERTSSON, B. CURRIE, K. FOLKERS, C. Y. BOWERS, *J. Med. Chem.*, **14**, 484 (1971).
21. W. VOELTER, H. BAUER, ST. FUCHS, E. PIETRZIK, *J. Chromatogr.*, **153**, 433 (1978).
22. P. GÖBEL, W. KLINGER, H. HORN, W. VOELTER, *Klin. Wshr.*, **52**, 1128 (1974).
23. H. SIEVERTSSON, J.-K. CHANG, K. FOLKERS, C. Y. BOWERS, *J. Med. Chem.*, **15**, 8 (1972).
24. W. VOELTER, H. HORN, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 1466 (1974).
25. E. SCHWERTNER, S. HERRLING, E. FRIEDERICH, S. M. KIM, L. FLOHÉ, in W. Voelter and G. Weitzer (eds): *Structure and Activity of Natural Peptides*, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1981).
26. E. FRIDERICH, E. SCHWERTNER, S. HERRLING, W.-A. GÜNZLER, F. ÖTTING, L. FLOHÉ, in W. VOELTER and G. WEITZEL (eds): *Structure and Activity of Natural Peptides*, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1981).
27. H. KALBACHER, K. ZECH, W. VOELTER, *Chemiker-Ztg.*, **99**, 460 (1975).
28. H. KALBACHER, W. A. KÖNIG, W. VOELTER, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1827 (1975).
29. W. KLINGLER, H. KALBACHER, P. GÖBEL, F. J. SEIF, K. ZECH, W. VOELTER, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 269 (1976).
30. W. VOELTER, H. KALBACHER, K.-P. ZELLER, *Chemiker-Ztg.*, **100**, 238 (1976).
31. H. KALBACHER, W. VOELTER, M. VAJDA, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **95**, 67 (1977).
32. M. PRZYBYLSKI, W. VOELTER, in W. VOELTER and G. WEITZER (eds): *Structure and Activity of Natural Peptides*, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1981).
33. S. FERMANDJIAN, P. FRADELLES, P. FROMAGEOT, *FEBS Letters*, **28**, 156 (1972).
34. W. VOELTER, O. OSTER, K. ZECH, *Angew. Chem.*, **86**, 46 (1974).
35. J. J. STEZOWSKI, C. BÜRVENICH, W. VOELTER, *Angew. Chem.*, **91**, 243 (1970).
36. K. KAMIYA, M. TAKAMOTO, Y. WADA, M. FUJINO, M. NISHIKAWA, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1980**, 438.
37. S. CASTENSSON, B. STENSLAND, *Abstracts 5th European Crystallography Meeting*, **1979**, 16.
38. M. FARKAS, W. VOELTER, in W. VOELTER and G. WEITZEL (eds): *Structure and Activity of Natural Peptides*, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1981).
39. P. L. WESSELS, J. FEENEY, H. GREGORY, J. J. GORMLEY, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1973**, 1691.
40. I. C. P. SMITH, R. DESLAURIERS, H. SAITO, R. WALTER, C. GARRIGOU-LAGRANGE, H. MCGREGOR, D. SARANTAKIS, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **222**, 597 (1973).
41. P. MARCHE, J.-L. MORGAT, P. FROMAGEOT, *Eur. J. Biochem.*, **40**, 513 (1973).
42. J. RIVIER, P. BRAZEAU, W. VALE, N. LING, R. BURGUS, C. GILON, J. YARDLEY, R. GUILLEMIN, *C. R. Acad. Sci.*, **276**, 2737 (1973).
43. D. SARANTAKIS, W. A. MCKINLEY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 234 (1973).
44. H. U. IMMER, K. SESTANJ, V. R. NELSON, M. GÖTZ, *Helv. Chim. Acta*, **57**, 730 (1974).
45. N. FUJII, H. YAJIMA, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1596 (1975).
46. W. VOELTER, in R. F. BEERS, E. G. BASSETT (eds): *Polypeptide Hormones*, Raven Press, New York (1980).
47. H. KALBACHER, W. VOELTER, in W. VOELTER, G. WEITZEL (eds): *Structure and Activity of Natural Peptides*, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1981).
48. K. HALLENGA, G. VAN BINST, A. SCARSO, A. MICHEL, M. KNAPPENBERG, C. DREMIER, J. BRISON, J. DIRKX, *FEBS Lett.*, **119**, 47 (1980).
49. L. A. HOLLADAY, D. PUETT, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 1199 (1976).

## PEPTIDEK BIOLÓGIAI AKTIVITÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ OLDALLÁNC-FUNKCIÓSCSOPORT KÖLCSÖNHATÁSOK

BAJUSZ SÁNDOR

(Gyógyszerkutató Intézet, Budapest, Magyarország)

### Bevezetés

A peptidek minden tulajdonsága az őket alkotó aminosavak sorrendjéből vezethető le. Az oxitocinnal és a vazopresszinnel kapcsolatos első eredmények [1] mutattak rá arra, hogy nem minden alkotóelem okvetlenül szükséges. Például, ezeknek a hormonoknak a jellemző biológiai tulajdonságait a 3-as és 8-as helyen levő Ile/Phe és a Leu/Arg\* párok határozzák meg (l. 1. táblázat). Az Arg-vazopresszin viszonylag magas, az oxipresszin gyenge aktivitásából az következik, hogy az oxitocin-szerű (A és B tesztek) szempontjából az Ile<sup>3</sup> fontosabb mint a Leu<sup>8</sup>; a vazopresszin-szerű tulajdonságokhoz (C és D tesztek) az Arg<sup>8</sup> lényegesebb, mint a Phe<sup>3</sup>.

Ennek megfelelően a peptidek különböző (pl. ezen nonapeptidek az oxitocin-szerű, vazopresszin-szerű) tulajdonságait különböző, természetesen nem okvetlenül szomszédos, részek halmaza határozza meg. Ez teszi lehetővé, hogy bizonyos aminosav-rész(ek) helyettesítésével az eredeti aktivitást meg lehet változtatni. Ilyen változtatás(ok) segítségével előnyösebb tulajdonságú analógokhoz juthatunk, pl. jobb a transzport vagy kötő tulajdonság, megnövekedett a metabolitikus stabilitás, stb. Ezzel kapcsolatban a dezamino-oxitocinnal és a dezamino-vazopresszinnel végzett korábbi vizsgálatokra utalunk [1]. Ezeket a vegyületeket a natív hormonokból vezették le úgy, hogy a Cys<sup>1</sup> helyére 3-merkaptó-propionsavat vittek a molekulába, azaz a terminális NH<sub>2</sub> csoportot hidrogénatommal helyettesítették, abból a célból, hogy aminosavak helyettesítésével, különösen ezeknek a hormonoknak a metabolizmusában alapvető szerepet játszó oxitocinázzal szemben, növeljék a vegyület rezisztenciáját.

A 2. táblázat szerint, ez a változtatás az uterotonikus és az anti-diuretikus aktivitást minden peptid esetében megnövelte, de ugyanakkor csökkentette, vagy változatlanul hagyta az eredeti presszor aktivitást. Továbbá, az oxitocin és a Lys-vazopresszin mammotróp aktivitását csökkentette, míg az Arg-vazopresszin esetében lényegesen megnövelte. Ezen kívül a három peptid anti-diuretikus hatásában is különbség mutatkozik. Ugyanis az oxitocin és az Arg-vazopresszin potenciálja

\* Aminosavak, aminosav részek (tagok) és peptidek rövidítése az IUPAC-IUB Biokémiai Nomenklatura Bizottság ajánlásait követi (Biochemistry 11, 1726 (1972)). Ezen felül használt rövidítések: Boc, terc-butil-oxikarbonil; BZ, benzoi; pNA, p-nitro-fenilamino; Z, benzoiloxikarbonil.

1. táblázat

Oxitocin, Arg-vazopresszin és két hibrid-peptid<sup>a</sup> biológiai aktivitásai

Peptid	3-as és 8-as pozícióban levő részek		Viszonylagos hatékonyság (%) <sup>b</sup>			
			uteroton	mammotróp	presszor	antidiuretikus
			A	B	C	D
Oxitocin	Ile	Leu	100,0	100,0	1,3	1,2
Vazopresszin	Phe	Arg	3,5	14,2	100,0	100,0
Vazotocin	Ile	Arg	34,4	46,7	64,5	58,3
Oxipresszin	Phe	Leu	4,4	13,3	0,8	7,3

<sup>a</sup> Közös szekvencia: H-Cys-Tyr- -Gln-Asn-Cys-Pro- -Gly-NH<sub>2</sub>

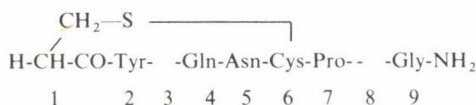
1 2 3 4 5 6 7 8 9

<sup>b</sup> Relatív hatékonyság, 100% egység/mg-ban a következőket jelenti: 450 (A és B), 380 (C) és 429 (D).

2. táblázat

A dezamino-oxitocin és dezamino-vazopresszin relatív aktivitása a kiinduló vegyülethez képest<sup>a</sup>

Az összehasonlítható peptid <sup>a</sup>	A 3-as és 8-as helyeken levő aminosav rész		Hatásarányok <sup>b</sup>			
			uteroton	mammotróp	presszor	antidiuretikus
			A	B	C	D
Dezamino-OT/OT	Ile	Leu	1,52	0,89	0,77	2,92
Dezamino-AVP/AVP	Phe	Arg	1,71	2,60	0,97	3,03
Dezamino-LVP/LVP	Phe	Lys	2,27	0,55	0,68	1,20

<sup>a</sup> OT, AVP és LVP oxitocint, Arg-vazopresszint és Lys-vazopresszint jelentenek. A dezamino-analógok közös szekvenciája:<sup>b</sup> Az [1]-es hivatkozásban megadott aktivitások egység/mg-ban a következők: OT: 450(A, B), 5(C, D); AVP: 16(A), 64(B), 380(C), 429(D); LVP: 5(A), 60(B), 270(C), 250(D).

lényegesen (300%-kal) megnőtt, míg a Lys-vazopresszin esetében csak kismértékben változott meg (120%).

Ez azt mutatja, hogy hasonló peptideknél azonos helyettesítés a biológiai aktivitásban eltérő változásokat okoz. Ebből kiindulva azt kell feltételeznünk, hogy az intra —, intermolekuláris kölcsönhatások alapvető hatást gyakorolnak a peptideknek az aminosav részekből előre megjósolható tulajdonságaira.

Egy aminosav „tényleges” hozzájárulását alig lehet a peptid tervezésnél figyelembe venni. Annak illusztrálására, hogy milyen gyakran fordul elő ez a jelenség



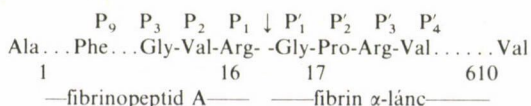
trombin és plazmin inhibitorokkal és igen hatékony enkefalin analógokkal kapcsolatos új eredményeinket szeretném bemutatni. A trombin és tripszin szubsztrátok körében végzett szerkezet-hatás összefüggéseket is tárgyalni fogjuk ebből a szempontból.

### A trombin és plazmin inhibitorok

A trombin és a plazmin két rendkívül fontos „tripszin-szerű” enzim, melyek a hemosztázisban játszanak szerepet. A trombin az oldható fibrinogént oldhatatlan fibrin polimerré alakítja át, bizonyos esetekben a plazmin ez utóbbit oldható fibrin töredékekké bontja föl. Az első reakció megakadályozása mely igen gyakran szükséges a klinikai gyakorlatban, volt természetesen az elsőrendű célunk, de a plazmin-fibrin reakció késleltetését is vizsgáltuk. Mindkét esetben peptid aldehideket vizsgáltunk, mivel előzőleg bebizonyosodott, hogy természetben előforduló [2] vagy szintetikus [3, 4] peptid aldehidek hatékonyan meg tudják akadályozni bizonyos proteínázok, mint a tripszin, elasztáz és a papain működését. A vegyületek gátló hatása könnyen megmagyarázható, ha feltételezzük, hogy a peptid aldehideket ugyanúgy mint a peptid észtereket és az amid szubsztrátokat aminosav oldalláncuk az enzim aktív helyére vezeti, az aldehid csoport az aktív OH (vagy SH) csoporttal tetraédes szemiacetál, egy nem-produktív átmeneti állapotú analóg képződése közben reagál.

A trombin-fibrinogén reakciót akadályozó, igen hatékony tripeptid aldehidet fejlesztettünk ki.

A fibrinogén három pár polipeptid láncból áll, melyeket  $A\alpha$ ,  $B\beta$  és  $\gamma$ -val jelölünk. A trombin a polimerizációt a két  $A\alpha$ -lánc Arg-Gly kötés hasításával indítja be (1. ábra), ezáltal a fibrinopeptid A szabadul fel és a polimerizáció szempontjából alapvető  $\alpha$ -lánc N-terminálisának Gly-Pro-Arg szekvenciája felnyílik.



1. ábra. A fibrinogén A  $\alpha$ -láncának trombin érzékeny része

BLOMBÄCK és munkatársai korábbi megfigyelése szerint [5] az  $A\alpha$ -lánc  $P_9$ ,  $P_2$  és  $P_1$  alegységeit tartalmazó Phe-Val-Arg-OMe tripeptid nemcsak jó észter szubsztrátja a trombinnak, hanem meghosszabbítja a fibrinogén alvadási idejét, azaz késlelteti a trombin-fibrinogén reakciót. DORMAN munkatársaival [6] az  $\alpha$ -lánc szabad tripeptid fragmensének gátló hatását fedezte fel. Ezekből kiindulva négy tripeptid aldehidet állítottunk elő és vizsgáltuk tulajdonságaikat ([7] és 3. táblázat).

\* SCHECHTER és BERGER jelölését használjuk a szubsztrátok és inhibitorok alegységeire/részeire (Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, 157 (1967)). Az enzimek ellen-oldalát  $S'_1$ ,  $S_1$ ,  $S'_2$ ,  $S_2$ , stb.-vel jelöljük.

3. táblázat

*Tripeptid aldehidek antitrombin aktivitása*

Inhibitor	Relatív aktivitás <sup>a</sup>		Inhibitor	Relatív aktivitás <sup>a</sup>	
	A	B		A	B
Gly-Val-Arg-H	1,0	0,1	Gly-Pro-Arg-H	9,2	1,0
Phe-Val-Arg-H	5,2	0,6	Phe-Pro-Arg-H	66,6	7,2

<sup>a</sup> A fibrinogén alvadási idejének megkettőzéséhez szükséges moláris koncentráció a Gly-Val-Arg-H (1,26 mM; A) és a Gly-Pro-Arg-H (0,14 mM; B) megfelelő értékeivel összehasonlítva.

Nyilvánvalóan Gly- és Phe-Val-Arg-H kevésbé jól gátol mint Gly- vagy Phe-Pro-Arg-H. Más szóval trombin stabilabb komplexeket képez a Pro-tartalmú peptidekkel mint a megfelelő Val analóg. A Pro származékok trombinnal szembeni magas aktivitása azzal a ténnyel magyarázható, hogy a Pro-Arg rész azonos a másik két natív szubsztrát  $P_2$ — $P_1$  alegységeivel, azaz protrombinnal és faktor XIII-mal, melyben a trombin érzékeny részek az Ile-Pro-Arg-↓-Ser és a Val-Pro-Arg-↓-Gly. Ami azonban a fibrinogént illeti, az aktívabb prolin analógok az  $\alpha$ -lánc *N*-terminális részével hozhatók kapcsolatba, melyet a trombin nem hasít, és éppen a kevésbé hatékony Gly- és Phe-Val-Arg-H rendelkezik az  $A\alpha$ -lánc szubsztrát fragmensének  $P_2$ — $P_1$  alegységeivel (1. ábra). A szerkezet-hatás összefüggés felderítése értékes segítséget nyújtott a Phe-Pro-Arg-H gátló hatásának javításához.

Fel lehet tételezni, hogy a hasítás helyének közelében levő oldallánc részek vesznek részt az enzim-szubsztrát komplex képződésben. Így a fibrinogén Val-Arg vagy Gly-Val-Arg része, azaz a  $P_3$ — $P_2$ — $P_1$  alegységek kombinálódhatnak a trombinban levő megfelelő partnereikkel, azaz az  $S_3$ — $S_2$ — $S_1$  alegységekkel, éppen azokkal, melyek a legkevésbé aktív Gly-Val-Arg-H kötődésében vesznek részt. A legaktívabb analóg, a Phe-Pro-Arg-H esetében viszont a Phe-Pro rész a trombin  $S_3^*$  és az  $S_2^*$  alegységekkel reagálhat. Ezt a kölcsönhatást a fibrinogén kevésbé zavarja, következésképpen a trombin-fibrinogén komplex Phe-Pro-Arg-H jelenlétében nehezebben képződik, mint Gly-Val-Arg-H jelenlétében. Abból kiindulva, hogy az *N*-terminálisnál levő D-aminosav rész a tripeptid aldehidben feltehetően talál egy olyan trombin alegységet, mely egyáltalán nem vesz részt a fibrinogén kötődésben, és ezért az enzim-inhibitor komplex fibrinogén jelenlétében is igazán stabilis, elhatároztuk, hogy D-Ala, D-Val és D-Phe részeket kapcsolunk a Pro-Arg-H egységhez. A megfelelő Phe-Pro-Arg-H és Phe-Val-Arg-H aktivitásával összevetett viszonylagos potenciálokat a 4. táblázat tartalmazza.

A táblázat adataiból kitűnik, hogy mind a Phe-Pro-Arg-H, mind a Phe-Val-Arg-H esetében a Phe D-aminosavval történő helyettesítése a D-Ala, D-Val és D-Phe sorrendben növelte a gátló hatást. A gátlás mértéke viszont a szomszédos tagoktól függ. Különösen a D-Ala és a D-Val esetében ugyanis a D-aminosav helyettesítés jobban megnövelte a Phe-Pro-Arg-H aktivitását mint a Phe-Val-Arg-H aldehidét. Ez



4. táblázat

Az N-terminálison D-aminosavat tartalmazó tripeptid aldehidek antitrombin aktivitása

Inhibitor	Relatív aktivitás <sup>a</sup>		Inhibitor	Relatív aktivitás <sup>a</sup>	
	A	B		A	B
Phe-Pro-Arg-H	1,0	12,8	Phe-Val-Arg-H	1,0	0,1
D-Ala-Pro-Arg-H	6,9	88,0	D-Ala-Val-Arg-H	1,7	0,1
D-Val-Pro-Arg-H	18,8	237,8	D-Val-Val-Arg-H	5,9	0,5
D-Phe-Pro-Arg-H	109,5	1396,8	D-Phe-Val-Arg-H	88,0	6,9

<sup>a</sup> A fibrinogén alvadási idejének megkettőzéséhez szükséges moláris koncentrációt a Phe-Pro-Arg-H (19  $\mu$ M; A) és a Phe-Val-Arg-H (0,24 mM; B) megfelelő értékeihez viszonyítjuk.

lényegében véve azt jelenti, hogy a szomszédos Yyy tag jelentős mértékben befolyásolja az N-terminális D-Xxx hozzájárulását a tripeptid aldehyd gátló aktivitásához.

A gátlással összevetve a trombin katalizált polimerizáció viszonylag egyszerű reakció, hiszen csak egy protolitikus lépés, az Arg-Gly kötés hasítására van szükség az egész folyamat lelassításához (l. 1. ábra). Következő példánk, a fibrin (vagy fibrinogén) plazminnal történő lebontása összetettebb folyamat. Ugyanis a plazmin a 362 Arg/Lys-X kötés közül negyvenet támad meg a fibrin(ogén)ben. Ezek közül néhány kötés már az első tíz percben felhasad a lebontás következtében, a többi csak néhány óra múlva. Azok a különbségek, melyeket a peptid kötés plazminnal szembeni érzékenységeiben tapasztalunk elsősorban eltérő kitettségeknek tudhatók be, de bizonyos korreláció figyelhető meg a  $P_1-P'_1$  kötés hidrolízis sebessége és a  $P_2-P_1$  alegységek típusa között. Így pl. a lebontás első fázisában (10 perc) aromás tagok (Phe, Tyr vagy Trp) és Lys található a  $P_2$  és a  $P_1$  pozíciókban. Más fragmensekben, pl. a Leu-Lys- $\downarrow$ -Ser, Ile-Lys- $\downarrow$ -Ala és Val-Arg- $\downarrow$ -Gly részekben a hidrolízis csak közepes vagy lassú sebességgel megy végbe. A legutolsó fragmens, mely csak kétórás lebontás után szakad fel a Gly-Pro-Arg- $\downarrow$ -Val rész az  $\alpha$ -láncban, melyből a hatékony trombin inhibitor, a D-Phe-Pro-Arg-H-t építettük fel. Ennek Boc származéka, a Boc-D-Phe-Pro-Arg-H mind a trombin-fibrinogén és a plazmin-fibrin reakció erős inhibitora. Ebből kiindulva megvizsgáltuk, mik a plazminos fibrin lebontás gátlásának szerkezeti követelményei.

Olyan Boc védett tripeptid aldehideket állítottunk elő és vizsgáltunk, melyekben a lebontás „korai”, „késői” és „igen késői” szakaszában megtámadott  $P_2-P_1$  fibrin fragmenseket Phe-Lys, Leu-Lys és Pro-Arg tagokkal reprezentáltuk. Az 5. táblázat adatai szerint a Phe-Lys szegmenst tartalmazó aldehidek (I, II), melyek a plazmin által „korai” fázisban megtámadott fibrin fragmensnek felelnek meg, a proteolitikus bomlást jobban tudták késleltetni, mint az emésztés későbbi fázisában hasadó szubsztrát fragmens Leu-Lys része (III, IV). Mégis a Boc-D-Phe-Pro-Arg-H (VI)-nak volt az aktivitása a legnagyobb, ennek oka nem lehet egyedül a Pro-Arg rész, mivel a megfelelő Gln analóg (VII) meglehetősen kis aktivitású. Ez azt jelenti, hogy a  $P_2-P_1$



résznél levő Pro-Arg rész D-Phe jelenlétét kívánja meg a P<sub>3</sub>-nál, de ez utóbbi jelenléte kedvezőtlen Phe-Lys és Leu-Lys mellett.

Abból a célból, hogy ezt a jelenséget számszerű adatokkal is alátámasszuk, csak egy tagban különböző tripeptid aldehideket választottunk ki és összehasonlítottuk hatásukat (6. táblázat). A I/II, III/IV és V/VI peptid párokra kapott potenciál arányok arra mutatnak, hogy a P<sub>3</sub> helyen levő Gln a P<sub>4</sub>, P<sub>2</sub> és P<sub>1</sub> helyeken levő tagoktól függően a D-Phe-hez képest lehet kissé kedvezőbb (3,09-szer), sokkal kedvezőbb (1290-szer) vagy kevésbé kedvező (20-szor). A III/VIII és V/VII peptid párokra számított arányokból a P<sub>2</sub> helyen levő Pro és Leu tagokra hasonló következtetést vonhatunk le. Arg épp olyan alkalmas lehet, mint Lys, ha a Boc-Gln-Leu mellett helyezkedik el, de ha Boc-D-Phe-Pro előtt van, akkor harmincszor előnyösebb, mint a Lys.

Ennek megfelelően a tripeptid aldehidek antiplazmin aktivitásához való egyedi aminosav hozzájárulást más tagok is befolyásolják. Ez a tény azt jelzi, hogy az

5. táblázat

A tripeptid aldehidek antiplazmin aktivitása

No.	Inhibitor P <sub>4</sub> —P <sub>3</sub> —P <sub>2</sub> —P <sub>1</sub> —H	Relatív potenciál <sup>a</sup>
I	Boc-D-Phe-Phe-Lys-H	19,5
II	Boc—Gln-Phe-Lys-H	60,2
III	Boc-D-Phe-Leu-Lys-H	<0,01
IV	Boc—Gln-Leu-Lys-H	12,9
V	Boc—Gln-Leu-Arg-H	12,4
VI	Boc-D-Phe-Pro-Arg-H	100,0
VII	Boc—Gln-Pro-Arg-H	4,8
VIII	Boc—O-Phe-Pro-Lys-H	3,2

<sup>a</sup> A fibrin lisis idejének megkettőzéséhez szükséges koncentrációból (68 nM) kiindulva a Boc-D-Phe-Pro-Arg-H aktivitását 100%-nak tekintjük.

6. táblázat

Tripeptid aldehidek antiplazmin aktivitásában bekövetkező változás, ha X tagot Y-ra cserélünk

Száмок az 5. táblázatban	Helyettesítés		A tanulmányozott peptid párok P <sub>4</sub> —P <sub>3</sub> —P <sub>2</sub> —P <sub>1</sub> —H	Potenciál arány <sup>a</sup>
	X-ről	Y-ra		
I/II	D-Phe	Gln	Boc-X/Y-Phe-Lys-H	3,09
III/IV	D-Phe	Gln	Boc-X/Y-Leu-Lys-H	1290
VI/VII	D-Phe	Gln	Boc-X/Y-Pro-Arg-H	0,05
III/VIII	Leu	Pro	Boc-D-Phe-X/Y-Lys-H	320
V/VII	Leu	Pro	Boc-Gln-X/Y-Arg-H	0,48
IV/V	Lys	Arg	Boc-Gln-Leu-X/Y-H	0,96
VIII/VI	Lys	Arg	Boc-D-Phe-Pro-X/Y-H	31,25

<sup>a</sup> Az Y-t tartalmazó tripeptid aldehidek potenciálját elosztottuk az X-tartalmú megfelelő értékével (az utóbbiak az 5. táblázatban láthatók).

aminosav építőkövek kölcsönhatnak egymással. A 6. táblázat adatai alapján nem tudjuk kizárni, hogy létezik egy olyan Ac-Xxx-Leu-Lys-H peptid, melynek nagyobb az antiplazmin aktivitása, mint a megfelelő Phe analógé. Ez azt jelenti, hogy nem lehet valódi szerkezet-aktivitás összefüggést találni, olyan peptidekre, melyek a kiinduló vegyülettől több mint egy helyen különböznek.

### Enkefalin analógok

Met- és Leu-enkefalin két opioid peptid, melyet HUGHES és munkatársai disznó agyból izoláltak [9] azonos a  $\beta$ -lipotropin 61—65-ös fragmensével, illetve annak Leu<sup>65</sup> analógiával. In vitro körülmények között, így tengerimalac ileumban (GPI) és egér vas Deferensben (MVD) igazolták a morfin-szerű aktivitását (7. táblázat). A morfinnal ellentétben ezek a pentapeptid MVD-n nagyobb aktivitást mutatnak, mint GPI-n és ami a legérdekesebb, nincs analgetikus aktivitásuk. Nem sokkal később, több csoport is beszámolt arról, hogy a  $\beta$ -lipotropin 61—69 fragmense az ún.  $\beta$ -endorfin, melyet a pituitariumból izoláltak, szintén opioid aktivitással bír, nem csak in vitro, hanem in vivo is, mivel az egéren analgetikus hatást vált ki intracerebroventrikuláris (i.c.v.) és intravénás (i.v.) alkalmazás során.

A szintetikus munka első célja természetesen az volt, hogy erős analgetikus hatású enkefalin analógokat fejlesszünk ki.

Ezt [D-Met<sup>2</sup>,Pro<sup>5</sup>]-enkefalinamid [15] előállításával értük el, melynek analgetikus aktivitása mind a morfinnál, mind a  $\beta$ -endorfinnál nagyobb, és a hatás jelleg a  $\beta$ -endorfinéhoz hasonló, mivel a két in vitro teszten kb. azonos hatékonyságú. Ezt követően az N-terminálison guanido csoportot tartalmazó peptideket állítottunk elő [16]. A vegyületek közül néhány alacsony MVD/GPI potenciálú, hasonló a

7. táblázat

Opioidpeptidek és a morfin aktivitásának összehasonlítása

Anyag	MVD <sup>a</sup>	GPI <sup>a</sup>	MVD GPI	RB <sup>b</sup>	MFTC	
					i.c.v.	i.v.
Met-enkefalin <sup>d</sup>	78,1	10,4	7,5	0,25	0,02	0
Leu-enkefalin <sup>e</sup>	128,2	2,1	61,0	—	0,02	0
$\beta$ -endorfin	17,9	13,9	1,28	8,0	34,7	4,2
Morfin	2,03	14,4	0,14	1,0	1,0	1,0

<sup>a</sup> In vitro aktivitásokat [10] adatai alapján számítottuk, és  $10^{-6}/IC_{50}M$ -ben adjuk meg.

<sup>b</sup> A receptor kötő kapacitást (RB) a morfinéhoz hasonlítjuk.

<sup>c</sup> Az analgetikumokra mért in vivo aktivitásokat az egér farokcsapás teszt (MFT) alapján mérjük és a morfinéra vonatkoztatjuk [12, 13].

<sup>d</sup>  $\beta$ -lipotropin-(61-65): Tyr-Gly-Gly-Phe-Met.

<sup>e</sup> [Leu<sup>65</sup>]  $\beta$ -lipotropin-(61-65): Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu.

<sup>f</sup>  $\beta$ -lipotropin-(61-69).



morfinhoz. Végül a „C”-terminálison szulfonsav és foszfonsavat tartalmazó analógokat állítottunk elő [17] abból a célból, hogy enkefalin-szerű aktivitású analógokat kapjunk, azaz olyan vegyületeket, melyek MVD/GPI aránya nagy.

Ebből a munkából néhány példát véve, azt kívánom bemutatni, hogy az oldalláncokban és a funkciós csoportokban végrehajtott helyettesítések hogyan befolyásolják a kiinduló vegyülethez képest a biológiai aktivitást.

Foglalkozunk először D-aminosavat tartalmazó enkefalin analógokkal, pontosabban a D-Ala<sup>2</sup> két közeli rokon taggal, a D-Nle és a D-Met-tel való helyettesítésével. A 8. táblázat adataiból kitűnik, hogy ilyen helyettesítés a Pro<sup>5</sup> analógok aktivitására nagyobb hatást gyakorol, mint az Nle<sup>5</sup> esetében. Továbbá, a Pro<sup>5</sup> tagnak kedvez a D-Nle<sup>2</sup> jelenléte, mely alkalmatlan (MVD) vagy inszignifikáns (GPI) volt a Nle<sup>5</sup> esetében. Az MVD/GPI aktivitás arányok figyelembe vételével azt a következtetést lehet levonni, hogy az aktivitási képet jobban meghatározzák a C-terminálison levő Nle és Pro tagok, és különösen a C-terminálinál a negatív töltés jelenléte ill. hiánya mint a 2-es pozícióban levő D-aminosav. Az összes Nle<sup>5</sup> analóg nagy MVD/GPI arányt mutatott, ez a tulajdonság jellemző a természetes enkefalinra. A rokon Pro<sup>5</sup> analógokra sokkal kisebb érték adódott, de egynél kisebb értéket csak a peptid amidok esetében találtunk. Ez utóbbi biológiai profil sokkal jobban hasonlít a  $\beta$ -endorfinéra vagy morfinéra, mint az enkefalinéra.

A C-terminálison Met, Leu és Nva tagokat tartalmazó enkefalin amid analógoknál ellentétes végkövetkeztetésre jutottunk (9. táblázat). Ugyanis minden D-Ala<sup>2</sup> tagot tartalmazó peptid potenciálja MVD-n nagyobb, mint GPI-ben, míg a megfelelő D-Met<sup>2</sup> analóg ellentétes sajátosságú. Ez azt jelenti, hogy a D-Ala<sup>2</sup>, D-Met helyettesítés megváltoztatta ezeknek a peptideknek az aktivitását.

Ezt követően a funkciós csoportok és az oldalláncok közötti kölcsönhatásra szeretnék néhány példát bemutatni.

Laboratóriumunkban azt találtuk, hogy az Nle<sup>5</sup>-enkefalin opioid agonista aktivitása lényegesen megnőtt, ha a COOH csoportot SO<sub>3</sub>H vagy PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> csoporttal

8. táblázat

Tyr-D-Xxx-Gly-Phe-Yyy<sup>a</sup> típusú enkefalin analógok *in vitro* aktivitása

Vizsgálat	MVD	GPI	$\frac{\text{MVD}}{\text{GPI}}$	MVD	GPI	$\frac{\text{MVD}}{\text{GPI}}$	MVD	GPI	$\frac{\text{MVD}}{\text{GPI}}$
Xxx <sup>2</sup> \ Yyy <sup>5</sup>	Nle			Pro			Pro-NH <sub>2</sub>		
D-Ala	1 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>	65,4	1 <sup>d</sup>	1 <sup>e</sup>	1,4	1 <sup>f</sup>	1 <sup>g</sup>	0,70
D-Nle	0,8	1,1	46,2	40,2	18,1	3,2	14,1	12,8	0,79
D-Met	1,7	1,7	65,4	24,1	7,5	4,6	11,7	8,6	0,95

<sup>a</sup> [15], [18–21] hivatkozások adataiból számítottuk ki. 10<sup>-6</sup>/IC<sub>50</sub>M egységekben kifejezett, MVD és GPI vizsgálatokon kapott aktivitások a D-Ala<sup>2</sup> analógokra a következők: 1000,0(b); 15,3(c); 3,6(d); 2,5(e); 3,7(f) és 5,3(g).



9. táblázat

Tyr-D-Xxx-Gly-Phe-Yyy-NH<sub>2</sub> típusú enkefalin analógok opioid aktivitása

Vizsgálat	Xxx <sup>2</sup>	Yyy <sup>5</sup>	Met	Leu	Nva
MVD	D-Ala		166,7	111,1	142,9
GPI			20,9	21,4	40,0
MVD	D-Met		35,7	29,1	58,8
GPI			57,6	31,5	90,0
MVD	D-Ala		7,98	5,19	3,57
GPI			0,62	0,92	0,65

<sup>a</sup> [22–24]-es hivatkozások szerint kiszámított értékek 10<sup>-6</sup>/IC<sub>50</sub>M-ban.

10. táblázat

Tyr-Xxx-Gly-Phe-NH-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-Q<sup>a</sup> típusú Nle<sup>5</sup>-enkefalinok relatív in vitro aktivitása

Vizsgálat		MVD			GPI		
Xxx	Q	COOH	SO <sub>3</sub> H	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	COOH	SO <sub>3</sub> H	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>
Gly		1 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>d</sup>	1 <sup>e</sup>	1 <sup>f</sup>	1 <sup>g</sup>
D-Ala		20,2	7,6	11,9	5,7	2,5	7,8
D-Nle		16,1	20,2	9,8	6,2	6,9	3,4
D-Met		34,4	8,6	1,4	9,6	3,2	1,2

<sup>a</sup> A [17]-es hivatkozás alapján számított értékek.<sup>a-g</sup> A Gly<sup>2</sup> analógok 10<sup>-6</sup>/IC<sub>50</sub>M egységben kifejezett aktivitásai: 48,5(b); 235,9(c); 431,0 (d); 2,7(e); 17,0(f) és 7,8(g).

helyettesítettük. Mint ahogy a 10. táblázatból látható, a Gly<sup>2</sup> tag D-aminosavval való helyettesítése a hatást tovább növelte. A relatív potenciálok összevetése szerint viszont a három legaktívabb vegyületben különböző sav csoport és D-Xxx<sup>2</sup> tagok vannak.

Ennek az az oka, hogy a COOH csoport akkor kedvezőbb, ha a D-Nle vagy D-Ala helyett a 2-es helyen D-Met van. Az SO<sub>3</sub>H csoport viszont D-Nle<sup>2</sup>-vel kombinálva előnyösebb, ugyanis a D-Ala<sup>2</sup> és D-Met<sup>2</sup> analógok csak fele olyan aktívak. A legaktívabb PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> végcsoportú származék D-Ala<sup>2</sup> tagot tartalmaz. A rokon D-Met<sup>2</sup>-t tartalmazó ilyen típusú származék hatékonysága a megfelelő Gly<sup>2</sup> analóggal összemérhető.

Más kísérletek szerint [16] a peptidek *in vivo* aktivitást az alkalmazási körülmények is befolyásolják. A 11. táblázatban négy igen hasonló peptid analgetikus hatását tüntettük fel. A D-Met-tel szomszédos Tyr amidinálása központi (i.c.v.) adagolás esetében sokkal jobban megnövelte az analgetikus aktivitást, mint i.v.

11. táblázat

Tyr-D-Xxx-Gly-Phe-NH<sub>2</sub> és (H<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>C<sup>+</sup>-Tyr-D-Xxx-Gly-Phe-NH<sub>2</sub> tetrapeptidek analgetikus aktivitásának összevetése morfinnal moláris alapon (= 1)<sup>a</sup>

-D-Xxx-	i.c.v.	i.v.	$\frac{\text{i.c.v.}}{\text{i.v.}}$
Tyr-D-Met-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	10,5 (1,0)	2,2 (1,0)	5,5
(H <sub>2</sub> N) <sub>2</sub> C <sup>+</sup> -Tyr-D-Met-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	210,0 (17,3)	4,4 (2,0)	47,7
Tyr-D-Nle-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	16,4 (1,0)	1,2 (1,0)	13,5
(H <sub>2</sub> N) <sub>2</sub> C <sup>+</sup> -Tyr-D-Nle-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	20,0 (1,2)	7,95 (6,6)	2,5

<sup>a</sup> A patkányfarkok-csőválás teszttel mért értékek intracerebroventrikuláris (i.c.v.) és intravénás (i.v.) injekció esetében. A megfelelő amino-terminális analógokkal összehasonlított potenciál arányokat zárójelben tüntettük fel.

injekció esetén. Ezzel szemben, a D-Nle taggal szomszédos ugyanilyen változtatás határozottan növelte az i.v. hatékonyságot, de az i.c.v. aktivitást gyakorlatilag nem változtatta meg.

Általánosan elfogadott, hogy a peptidek központi idegrendszeri aktivitása — metabolikus instabilitásuk következtében — központi adagolásnál magasabb, mint szisztematikus alkalmazásnál. Ebben az esetben azonban nem tudjuk ily módon megmagyarázni a különbséget, hiszen a kérdéses peptidek szerkezetileg igen hasonlóak. Sokkal valószínűbb, hogy az i.c.v./i.v. hatás arányokban mutatkozó különbségek a peptidek az injektálás helyétől a receptor(ok)hoz való eljutási képességben különböznek.

A peptidek nagy aktivitása számos tényezőtől, nemcsak a receptor(ok)kal való kölcsönhatási képességtől függ, így különböző karrierekkel, membránokkal lép kapcsolatba a peptid a szállítás során, azonkívül, hogy ellenállónak kell lenni enzimetikus lebontásokkal szemben.

### Tripszin és trombin szubsztrátjai

A peptid-fehérje kölcsönhatások közül a proteolitikus lépést tekinthetjük a legegyszerűbbnek. Először a szubsztrát molekula az enzimhez kapcsolódik, ezt követően egy adott peptid kötés felhasad, majd a szétszakadt termékek eltávoznak az enzimtől, ezáltal egy másik szubsztrát molekulának adják át a helyet. Könnyen mérhető kinetikus állandók, mint a  $k_m$  és a  $k_{cat}$  kapcsolatosak ezzel az eseménnyel. Az  $1/k_m$  az affinitással, azaz a peptid kötő képességével kapcsolatos,  $k_{cat}$  pedig a hidrolízis sebességével. Mivel ez utóbbi a hasítást és a disszociációs lépést is magában foglalja, mondhatjuk, hogy  $k_{cat}$  több eseményt ír le, mint  $k_m$ .

Az oldalláncok kölcsönhatásának bemutatása céljából ilyen viszonylag egyszerű rendszerben, 12 acil tripeptid *p*-nitro-anilidet, mint a tripszin, illetve trombin szubsztrátját hasonlítjuk össze. Erre a célra csak egy változót tartalmazó peptid



12. táblázat

A  $P_4-P_3-P_2$ -Arg-pNA kinetikus paramétereinek változása a  $P_2$  helyen a Pro, illetve Val-lal történő helyettesítése következtében

No.	$P_4$	$P_3$	$P_2$	$1/K_m^{\text{Pro}}$	$1/K_m^{\text{Val}}$	$k_{\text{cat}}^{\text{Pro}}$	$k_{\text{cat}}^{\text{Val}}$
				Tripszin	Trombin	Tripszin	Trombin
I	Bz	Leu	Pro/Val	1,93	0,91	1,27	7,50
II	Bz	Val	Pro/Val	1,17	1,02	1,71	9,99
III	Bz	Ile	Pro/Val	0,96	1,90	3,65	3,15
IV	Bz	Phe	Pro/Val	0,78	3,00	0,75	0,40
V	Z	Phe	Pro/Val	0,69	3,70	1,79	12,67

<sup>a</sup> A [26]-os és [27]-es hivatkozásokból vettük az adatokat.

13. táblázat

A  $P_4-P_3-P_2$ -Arg-pNA kinetikus paramétereinek változása annak következtében, hogy a  $P_3$  helyen levő Phe tagot alifás aminosavakkal (Xxx) helyettesítjük

No.	$P_4$	$P_3$	$P_2$	$1/K_m^{\text{Phe}}$	$1/K_m^{\text{Xxx}}$	$k_{\text{cat}}^{\text{Phe}}$	$k_{\text{cat}}^{\text{Xxx}}$
				Tripszin	Trombin	Tripszin	Trombin
I	Bz	Phe/Val	Pro	0,65	2,18	2,68	2,12
II	Bz	Phe/Val	Val	0,97	0,74	6,08	54,46
III	Bz	Phe/Ile	Pro	0,79	2,52	0,96	1,55
IV	Bz	Phe/Ile	Val	0,98	1,60	4,65	12,34
V	Bz	Phe/Leu	Pro	0,81	1,26	1,38	2,33
VI	Bz	Phe/Leu	Val	2,00	0,38	2,33	44,04

<sup>a</sup> [26] és [27] alapján számított.

párokat, A—X—B és A—Y—B választottunk. A kinetikus állandók aránya nyilvánvalóan akkor azonos, ha az X és Y oldalláncok tulajdonságát A és/vagy B nem befolyásolja [25]. Megfelelő kinetikus állandókat a [26]-os és [27]-es hivatkozásokból vettük.

A 12. táblázat öt olyan peptidpár adatait tartalmazza, melyeknél a  $P_4-P_3-P_2$ -Arg-pNA vegyületben Pro, illetve Val tag található a  $P_2$  helyen. Ebben az esetben figyelemmel tudjuk kísérni, hogy a helyettesítést milyen mértékben befolyásolják szomszédos alifás, illetve aromás tagok. Látható, hogy az  $1/K_m$  állandóban a változás meglehetősen kicsi, különösen a kevésbé specifikus tripszin enzim esetében. Nagyobb eltéréseket figyelhetünk meg a  $k_{\text{cat}}$  értékek arányában, különösen a specifikusabb trombin enzimnél. A két szélső érték, 0,40 és 12,67 az utolsó oszlopban található.

Hasonló kinetikus paraméter változásokat mutatunk be a 13. és 14. táblázatokban, ahol a  $P_3$ , illetve  $P_4$  helyettesítés hatását vizsgáltuk. A  $P_3$ -nál levő Phe tag alifás tagokkal való helyettesítése (13. táblázat) — egy kivételtől eltekintve — a peptidek tripszinnel szembeni aktivitására az előbbiekhöz hasonló hatással van, de a  $k_{\text{cat}}$  értékek



14. táblázat

A  $P_4-P_3-P_2$ -Arg-pNA kinetikus paramétereinek megváltozása a Bz-ről Z-re történő helyettesítés következtében a  $P_4$  helyen

$P_4$	$P_3$	$P_2$	$1/K_m^{Bz}$	:	$1/K_m^Z$	$k_{cat}^{Bz}$	:	$k_{cat}^Z$
			Tripszin		Trombin	Tripszin		Trombin
Bz/Z	Phe	Val	0,73 (0,85)		1,74 (1,08)	1,55 (0,26)		10,65 (1,19)
Bz/Z	Phe	Pro	0,82 (0,84)		1,41 (1,05)	0,65 (0,48)		0,33 (1,13)
Bz/Z	Lys	Pro	0,12 (0,70)		0,24 (1,08)	0,19 (0,44)		2,92 (1,25)

<sup>a</sup> A [26] és [27] hivatkozásokból vett, illetve számított adatok.

ebben az esetben jelentősen eltérőek. A 14. táblázat tanúsága szerint bizonyos esetekben azonos szubsztitúcióval még a tripszinnel szembeni affinitást is sikerült megváltoztatni.

A zárójelben levő arányokat regressziós analízissel a kinetikus állandókból számoltuk ki.

Az a tény, hogy ezek a zárójelben levő értékek gyakorlatilag megegyeznek arra utal, hogy ilyen matematikai eljárások el tudják tüntetni az oldallánc kölcsönhatásoknak a vizsgált paraméterekre gyakorolt hatását.

### Következtetések

A fenti példák azt mutatják be, hogy a biológiai aktív peptidekben az oldalláncok és a funkciós csoportok kölcsönhatásban vannak. Ezt a jelenséget nem lehet figyelmen kívül hagyni akkor, amikor (természetes) peptidek különösen hatékony származékait keressük, vagy szerkezet-hatás összefüggést kívánunk felállítani. Az oldalláncok vagy az oldalláncok és a funkciós csoportok különböző kombinálása szükséges, ha a peptid tulajdonságait, pl. a transzport tulajdonságát, vagy bizonyos receptorhoz való kötődését próbáljuk javítani, mely természetesen a peptid és egyéb molekulák közötti különféle kölcsönhatásokat foglalja magában. A szerkezet-hatás összefüggések összetettsége miatt, a különösen hatékony peptidek kifejlesztése nem „igazi tervezés”, hanem inkább egy „változtass és próbáld ki” eljárás, melynek során célunk az optimális szerkezet felkutatása. Ez az eljárás természetesen idő és munkaigényes, és nemcsak logikára, hanem ötletre és szerencsére is szükség van. Ahhoz, hogy előre megjósolható tulajdonságú peptidet tervezni tudjunk olyan korszerű matematikai modellre van szükség, mely az egyes tagok és az oldalláncok hozzájárulást is figyelembe tudja venni.

## Összefoglalás

Számos jelentős biológiai hatású peptidet (elsősorban enzim inhibitorokat és opioid peptideket) vizsgáltunk. Bizonyos szerkezeti változtatásnak a biológiai aktivitásra gyakorolt hatását tanulmányoztuk, ennek során az oldalláncok és a funkciócsoportok között kölcsönös függőséget állapítottunk meg. Egyedi tagok kicserélése során észlelt biológiai aktivitás változást ugyanazon molekula más részén végrehajtott egyidejű módosítás jelentősen befolyásolta. Következésképpen a többszörös kémiai változások nem írhatók le egyszerűen az egyedi változtatások összegzésével. Olyan matematikai elemzés, mely az oldallánc kölcsönhatását figyelmen kívül hagyja, helytelen eredményhez vezethet.

## Summary

Several peptides having considerable biological potency (mostly enzyme inhibitor and opioid peptides) were examined. Upon studying the influence on biological activity of certain structural modifications, interdependence has been observed among the side chains and functional groups. Namely, the influence of replacements of individual residues on the biological activity has been found considerably altered by simultaneous structural transformation(s) of other part of the same molecule. Consequently, the net result of multiple chemical modifications is not simply the sum of the individual effects. Mathematical analyses which disregard the effects of side chain interactions, i.e. based upon the additivity of analyzed parameters, may result in misleading conclusions.

## IRODALOM

1. E. SCHRÖDER, K. LÜBKE, *The Peptides II*, p. 320, 366, Academic Press, New York—London (1966).
2. H. UMEZAWA, *Enzyme Inhibitors of Microbial Origin*, University Park Press, Baltimore—London—Tokyo (1973).
3. J. O. WESTERIK, R. WOLFENDEN, *J. Biol. Chem.*, **247**, 8195 (1972).
4. R. C. THOMPSON, *Biochemistry*, **12**, 47 (1973).
5. B. BLOMBÄCK, M. BLOMBÄCK, P. OLSSON, L. SVENDSEN, G. ABERG, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **24**, Suppl. 107, 59 (1969).
6. L. C. DORMAN, R. C. CHOW, F. N. MARSHALL, in *Chemistry and Biology of Peptides* (Ed.: J. Meienhofer), p. 455, Ann Arbor Publ., Ann Arbor, Mich. (1972).
7. S. BAJUSZ, É. BARABÁS, E. SZÉLL, D. BAGDY, in *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Eds.: R. Walter and J. Meienhofer), p. 603, Ann Arbor Publ., Ann Arbor, Mich. (1975).
8. S. BAJUSZ, E. SZÉLL, É. BARABÁS, D. BAGDY, *Proceedings of the 7th American Peptide Symposium*, Madison, Wis., June 1981 (közlés alatt).
9. J. HUGHES, T. W. SMITH, H. W. KOSTERLITZ, L. A. FOTHERGILL, B. A. MORGAN, H. R. MORRIS, *Nature*, **258**, 577 (1975).
10. A. A. WATERFIELD, R. W. J. SMOKCUM, J. HUGHES, H. W. KOSTERLITZ, G. HENDERSON, *Eur. J. Pharmac.*, **43**, 107 (1977).
11. A. F. BRADBURY, D. G. SMYTH, C. R. SNELL, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 950 (1976).
12. L. F. TSENG, H. H. LOH, C. H. LI, *Nature*, **263**, 240 (1976).
13. H. H. LOH, L. F. TSENG, E. WEI, C. H. LI, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 2895 (1976).
14. C. H. LI, D. CHUNG, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 1145 (1976).
15. S. BAJUSZ, A. Z. RÓNAI, J. I. SZÉKELY, L. GRÁF, Z. DUNAI-KOVÁCS, I. BERZÉTEI, *FEBS Letters*, **76**, 91 (1977).
16. S. BAJUSZ, A. Z. RÓNAI, J. I. SZÉKELY, E. MIGLÉCZ, I. BERZÉTEI, *FEBS Letters*, **110**, 85 (1980).
17. S. BAJUSZ, A. Z. RÓNAI, J. I. SZÉKELY, A. TURÁN, A. JUHÁSZ, A. PATTHY, E. MIGLÉCZ, I. BERZÉTEI, *FEBS Letters*, **117**, 308 (1980).
18. J. I. SZÉKELY, A. Z. RÓNAI, Z. DUNAI-KOVÁCS, E. MIGLÉCZ, I. BERZÉTEI, S. BAJUSZ, L. GRÁF, *Eur. J. Pharmac.*, **43**, 293 (1977).

19. S. BAJUSZ, A. Z. RÓNAI, J. I. SZÉKELY, Z. DUNAI-KOVÁCS, I. BERZÉTEI, L. GRÁF, *Acta Biocim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, *11*, 305 (1976).
20. A. Z. RÓNAI, I. BERZÉTEI, in *Endorphins '78* (Eds.: L. Gráf, M. Palkovits and A. Z. Rónai), p. 237, Akadémiai Kiadó, Budapest (1978).
21. A. Z. RÓNAI, I. BERZÉTEI, J. I. SZÉKELY, L. GRÁF, S. BAJUSZ, *Pharmacology*, *18*, 18 (1979).
22. Y. AUDIGIER, H. MAZARGUIL, J. CROS, *FEBS Letters*, *110*, 88 (1980).
23. Y. AUDIGIER, H. MAZARGUIL, R. GOUT, J. CROS, *Eur. J. Pharmac.*, *63*, 35 (1980).
24. Y. AUDIGIER, R. GOUT, H. MAZARGUIL, J. CROS, *Eur. J. Pharmac.*, *64*, 187 (1980).
25. S. BAJUSZ, E. BARABÁS, P. TOLNAY, E. SZÉLL, D. BAGDY, *Int. J. Peptide Protein. Res.*, *12*, 217 (1978).
26. M. POZSGAY, G. CS. SZABÓ, S. BAJUSZ, R. SIMONSSON, R. GÁSPÁR, P. ELŐDI, *Eur. J. Biochem.*, *115*, 491 (1981).
27. M. POZSGAY, G. CS. SZABÓ, S. BAJUSZ, R. SIMONSSON, R. GÁSPÁR, P. ELŐDI, *Eur. J. Biochem.*, *115*, 497 (1981).



# MODELLREAKCIÓK ELEKTRONIKUS, SZTÉRIKUS ÉS EGYÉB EFFEKTUSOK TANULMÁNYOZÁSÁRA A NUKLEINSAVAK CIKLOADDÍCIÓS REAKCIÓIBAN

HEINRICH WAMHOFF

(Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,  
Gerhard Domagk Strasse 1, D-5300 Bonn 1, NSZK)

## A nukleinsavak fotokémiája

A nukleinsavak fotokémiájának és fotobiológiájának [1] a tanulmányozása rendkívül érdekes kutatási terület, mely az utóbbi években nagy figyelmet keltett különösen a (bakteriális) DNS *in vivo* és *in vitro* fotoinaktivációja [2], a rövid hullámhosszú UV-fénnyel való besugárzással történő reaktiválás [3] és a gyorsan fejlődő fotokemoterápia területén [4].

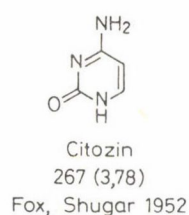
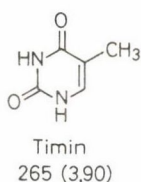
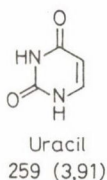
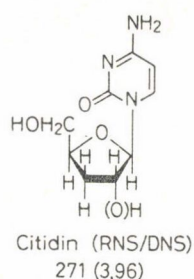
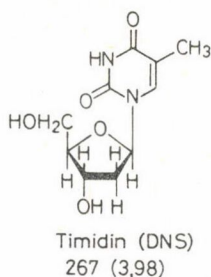
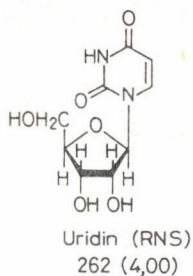
A fotokémia első törvényének megfelelően (Grotthus—Draper-elv) csak az abszorbeált fény képes fotokémiai effektusokat kiváltani. Így kiindulásképpen az 1. ábrán az uridin, timidin és citidin [5] nukleozidok, valamint összehasonlításképp alapvegyületeik, az uracil, timin és citozin és alkil származékaik [6], az 1,3-dimetil-6-azauracil [7] UV-abszorpcióit tüntettük fel.

A fő heterociklusos kromofór miatt az abszorpció értékek nagyon hasonlóak, és következésképp az *N,N*-dimetil származékok eredményeit jól lehet alkalmazni a nukleozidokra. Ezek az *N,N*-dimetil származékok ezért értékes modellvegyületeknek tekinthetők, melyeknek megvan az a nagy előnyük, hogy sokkal oldékonyabbak közönséges szerves oldószerekben, mint a szubsztituátlan pirimidinek (pl. 1,3-dimetil-uracil = „1,3-DMU”).

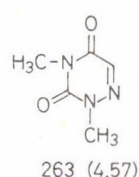
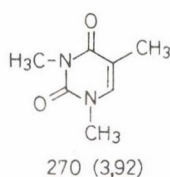
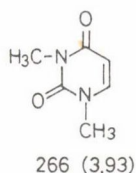
Ezek a pirimidinek az UV-fény abszorbeáló kromofórajainak következtében könnyen lépnek fotokémiai reakcióba, azaz ciklobután típusú dimerizációba, amint ez a 2. ábrán látható.

A DNS fotokémia legjelentősebb eredménye a timin dimer izolálása és azonosítása (BEUKERS és BERENDS) és a sztereokémia megállapítása egy jégmátrix [8] UV besugárzásával (WANG), mely szerint a termék *syn*-fej-fej.

Oldatban viszont a dimetiltimin fotodimerizációja a négy várt *cis*-dimerhez vezet [9]. Sőt, a timin dimer besugárzása hatásos hasadáshoz vezet a gerjesztőfény különleges hullámhossza miatt, hullámhosszfüggő fotostacionárius állapot érhető el. A fotostacionárius hányados a dimer oldalon van, 260 nm alatti hullámhosszaknál, ahol a dimer kezd abszorbeálni [2a, 3]. Ilyen monomerizációk felelősek a jól ismert, előzetesen UV-fénnyel károsított mikroorganizmusok fotoreaktiválódásáért [1, 3].



Modell vegyületek:



1. ábra. UV-abszorpciók összehasonlítása

Pirimidin dinukleotidok fotokémiájának szimulálására néhány timin dinukleotid analógot az 1,1', 3,3', 1,5'- és 1,3'-pozíciókban polimetilén láncokkal, mint szintetikus távolságtartókkal összekötve állítottunk elő és besugároztunk. A 300 nm-nél történő fotolízis bisz-timin analóghoz vezetett. Sztereokémiai kontrollal az intramolekuláris dimerizáció *cisz*-szün-*transz*-*anti*, és *cisz*-*anti* ciklobután termékekhez vezetett [10]. Erre a reakcióra néhány példát a 3. ábrán mutatunk be.

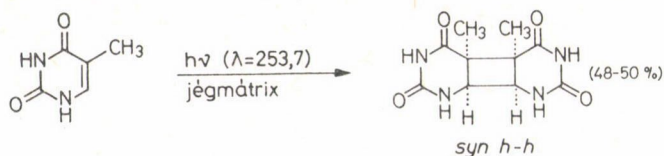
Utóbbi időben az 5-alkiluracilokból levezethető kvázimetaciklofánok elegáns szintézisét írták le az 1,1'-trimetilén-bisz(5-alkil)-uracilok ciklobután fotodimerjeinek összekapcsolásával, valamint a 3,3' helyzetben is trimetilén láncsal és azt követően a központi ciklobutángyűrű fotolízisével 254 nm-en [11].

E pirimidin bázisok nagy reaktivitása miatt az uracil és 1,3-DMU fotocikloaddíciója alkénekre jó eredménnyel megy végbe [12] (l. 4. ábra).

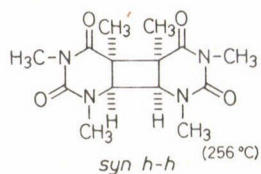
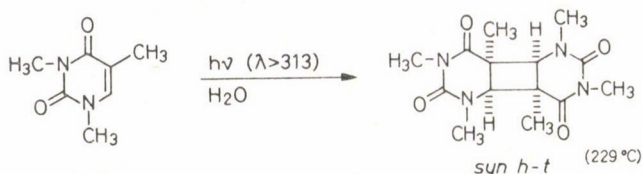
Ilyen (2 + 2) cikloaddíciók még 5-(*n*-propil)uracillal és -uridinnel is lejátszódnak egy Norrish II féle hasadásnak („dezalkilező cikloaddíció”) megfelelő átmeneti terméken keresztül [13] vagy Norrish II féle etilacetát hasadás útján [14].

Az 1,3-DMU és viniléterek vagy keténacetálok aceton-szenzitizált UV-besugárzása ciklobután típusú fototermékekhez vezet regiospecifikus reakcióban és nagy hozammal [15], hasonló (2 + 2) cikloaddíciót ciklohexénre írtak le [16].



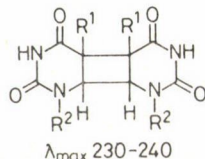
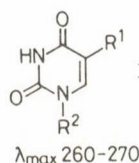
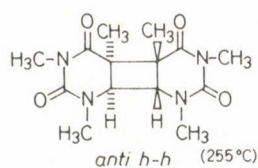
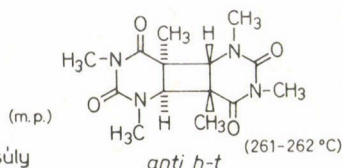


Benkers, Berends 1960  
Wang 1960  
Blackburn, Davies 1965/66



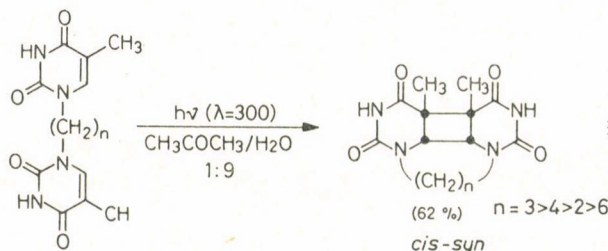
Kleopfer, Morrison 1972

Monomerizációs egyensúly



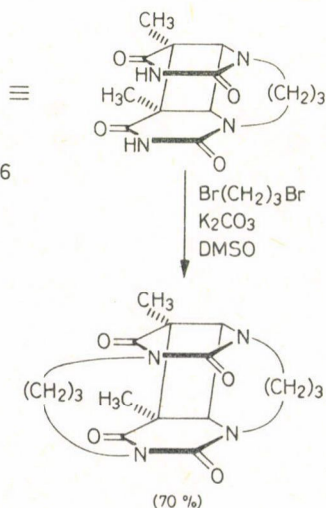
$R^1 = \text{H, CH}_3$   
 $R^2 = \text{H, ribozil, dezoxiribozil}$

2. ábra. Monomerizációs egyensúly

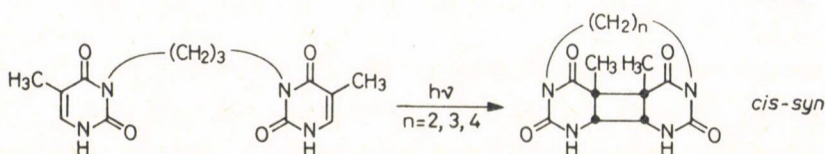
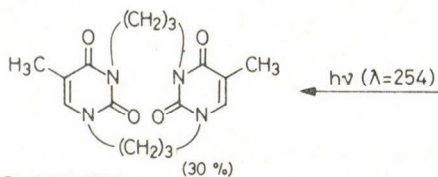


Leonard et al. 1973

Golankiewicz et al. 1974, 1978



Golankiewicz, Skalski 1978

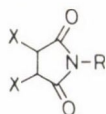


3. ábra. 1,1'- és 3,3' Bistiminekek

Leonard, Cundall 1974

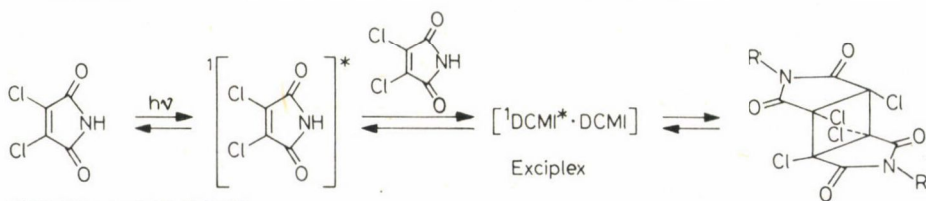






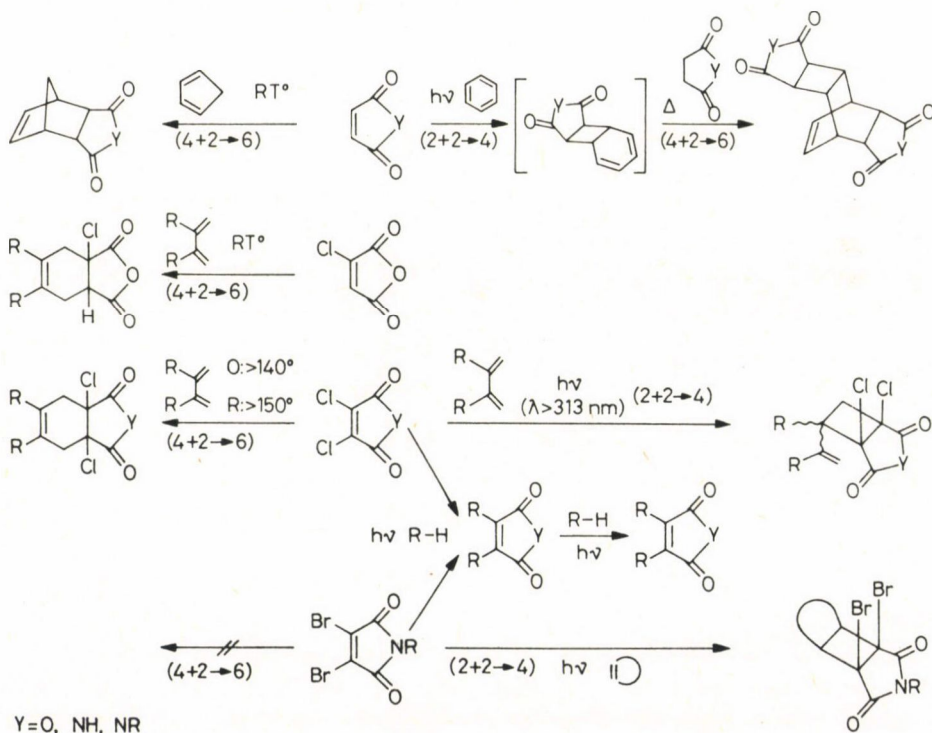
	X	R
DCMI	Cl	H
DBMI	Br	H
[NMe]DBMI	Br	CH <sub>3</sub>
DJMI	I	H
[NMe]DJMI	I	CH <sub>3</sub>

	$\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) [nm]		$E(S_1)$	$\Delta E(T_1)$	$\Delta E_{ST}$ [kcal/mol]
DCMI	234 (4,51)	292 (3,15)	82,9	55,5	27,4
DBMI	243 (4,20)	302 (3,20)	81,0	55,0	26,0
[NMe]DBMI	246 (4,10)	309 (2,77)			
DJMI	242 (4,14)	333 (3,56)	74,5	54,0	20,5



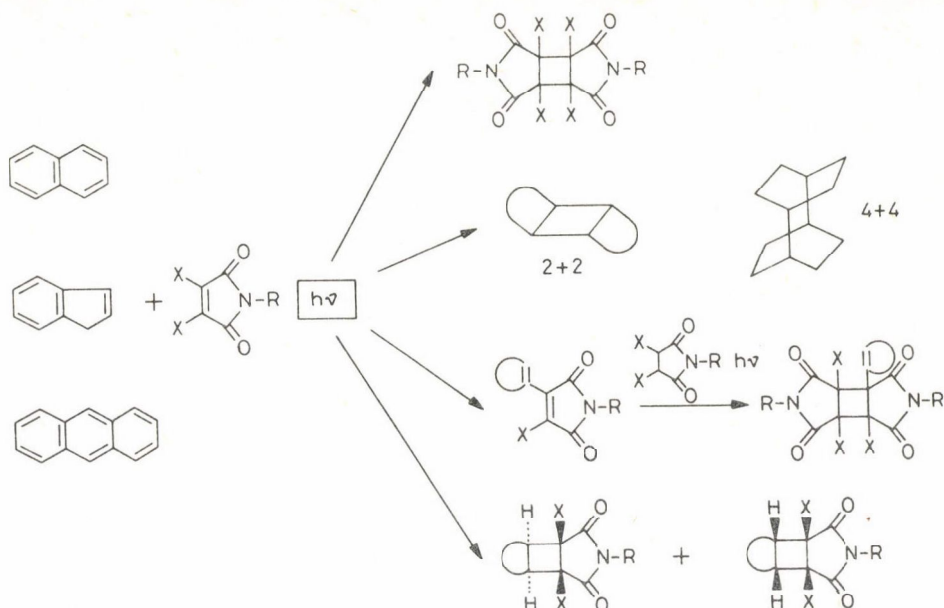
SCHARF et al. 1970, 1973

5. ábra. Dihalogén-maleinimid



Y=O, NH, NR

6. ábra. MA, MI, DXMA és DXMI mint (4+2)- és (2+2)-cikloolefinek



7. ábra. Általános reakcióséma

lefelé a Diels—Alder reaktivitás csökken a fotoindukált (2 + 2)-cikloaddíció javára [21, 22]. Ha a szubsztrát könnyen eltávolítható H-atomokat hordoz, akkor ezeken felül más fotoszubsztitúciót is észlelünk.

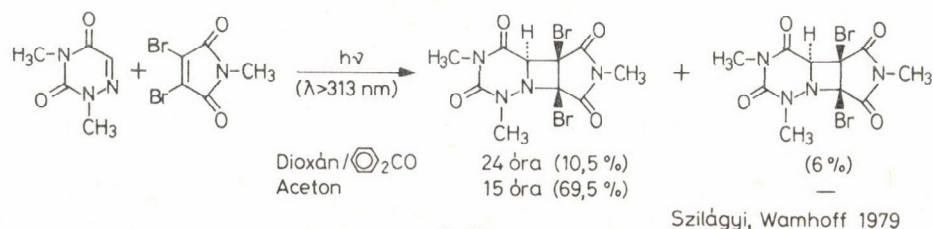
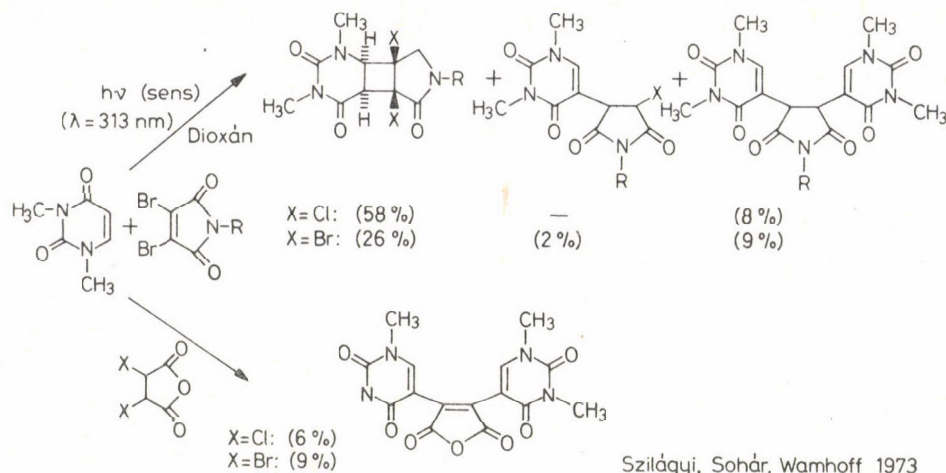
A következő ábrán (7. ábra) a DXMI-re általános reakciósémát mutatunk be különböző aromás vegyületekre. Ez a fotoreakció dimer DXMI vegyülethez, dimer szubsztráthoz, fotoszubsztituált termékekhez és (2 + 2)-cikloadduktokhoz vezet [22].

1,3-DMU besugárzása DXMI jelenlétében (2 + 2)-cikloaddíciós, 1:1- és 2:1 fotoszubsztitúciós termékekhez vezet [23]. Mégis még érzékenyítők hozzáadása után is a dihalomaleinsavanhidridek nem mutatnak ciklofil aktivitást; helyette csak egy 2:1 *bisz*-alkil terméket lehet izolálni [23] (8. ábra). A spektroszkópiai adatok *cisz*-anti-*cisz* anellációt igazolnak.

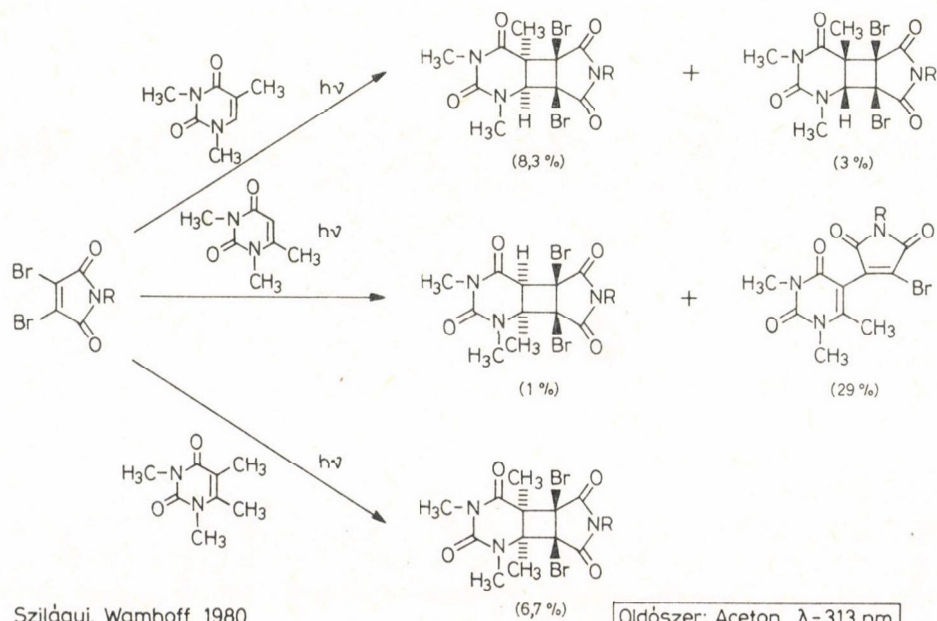
A megfelelő 1,3-dimetil-6-azauracil simán addicionál DBMI-t a C=N kettőskötésre (ismeretes, hogy ez sokkal kevésbé fotoreaktív [24]), míg az acetone mind oldószerként, mind érzékenyítőként is hat [25]. Ez az utóbbi időben felfedezett könnyű (2 + 2)-cikloaddíció fenil-szubsztituált DCMI-vel [26] is lejátsszódik, ami figyelemreméltó. Jól ismert [15, 27], hogy a 6-azatimin és 6-azauracil, melyek beépülnek a bakteriális DNS-be, növelik az UV-fénnyel szembeni ellenállást a gyenge cikloaddíciós hajlamuk miatt.

A DXMI uracilra történő fotocikloaddíciós reakcióiban a szubsztituens effektusokat is tanulmányozták. Hosszú hullámhosszú UV-fény *cisz*-anti-*cisz* és *cisz*-szűn-*cisz*-(2 + 2)-cikloadduktokat, 1,3-dimetiltimint szolgáltat 2,5:1 [26] arányban és semmi alkil terméket (9. ábra).





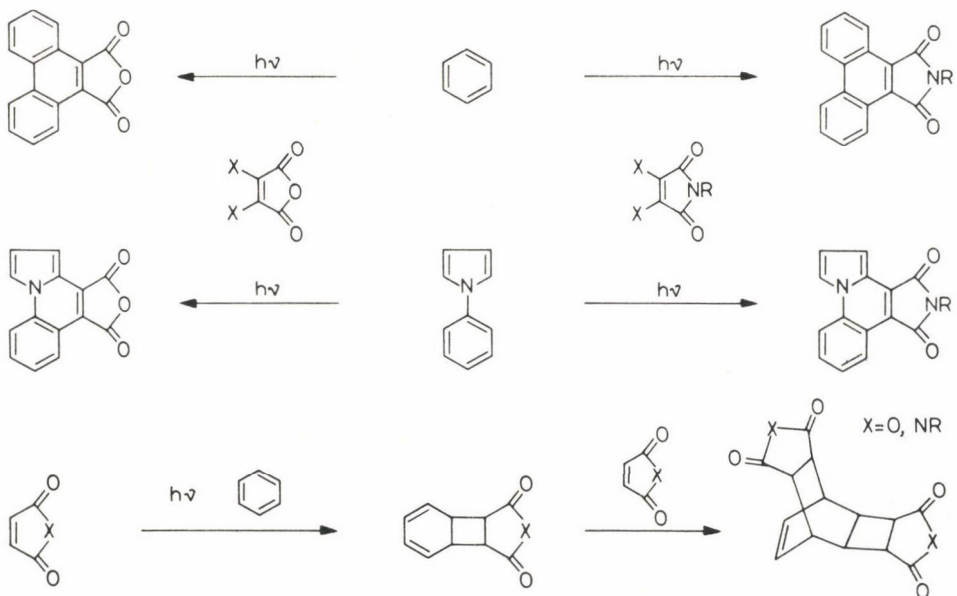
8. ábra



9. ábra. Szubsztituens effektusok

Viszont az 1,3,6-trimetiluracil a szabad és reaktív 5-ös helyzete miatt majdnem 1 : 1 arányú alkil terméket ad (2+2)-cikloaddukt nyomok mellett. Meglepő módon az 1,3,5,6-tetrametiluracil egy *cisz-anti-cisz* kapcsolódású (2+2)-cikloadduktot ad. Sztérikus effektusok uralják mind az irányítást, mind az anelláció sztereokémiáját. Ezek az eredmények jó összhangban vannak az uracil fotodimerizációjánál megfigyelt [28] szubsztituens hatással.

A 10. ábra a DXMI és DXMA néhány hasonló reakcióját körvonalazza az *N*-fenil-heterociklusok „anellációs fotoszubsztitúciójára” [22, 29] és a benzolra történő (2

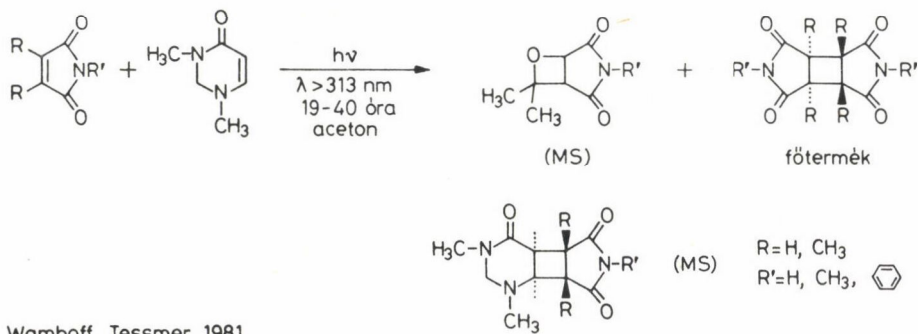


Matsuo, Mihara 1972/1975

Bryce-Smith, Gilbert et al. 1970-1975

Wamhoff et al. 1979, 1980

10. ábra. A D(X)MI és D(X)MA hasonlóságai



Wamhoff, Tessmer 1981

11. ábra. Egyszerű maleinimidek

+2)-fotocikloaddícióra [30] való tekintettel. A DXMI és DXMA teljesen eltérő fotokémiai viselkedése az 1,3-DMU-val szemben ezért nehezen érthető.

Szubsztituátlan maleinimidek vagy 3,4-dialkilmaleinimidek képesek ugyan fotoreakcióra, de csak gyenge hozammal (11. ábra).

(2+2)-cikloadduktok mellett, dimer maleinimideket izoláltak főtermékként. A tömegspektrometria Paternó—Büchi adduktokat mutatott ki nyomokban (l. 11. ábra).

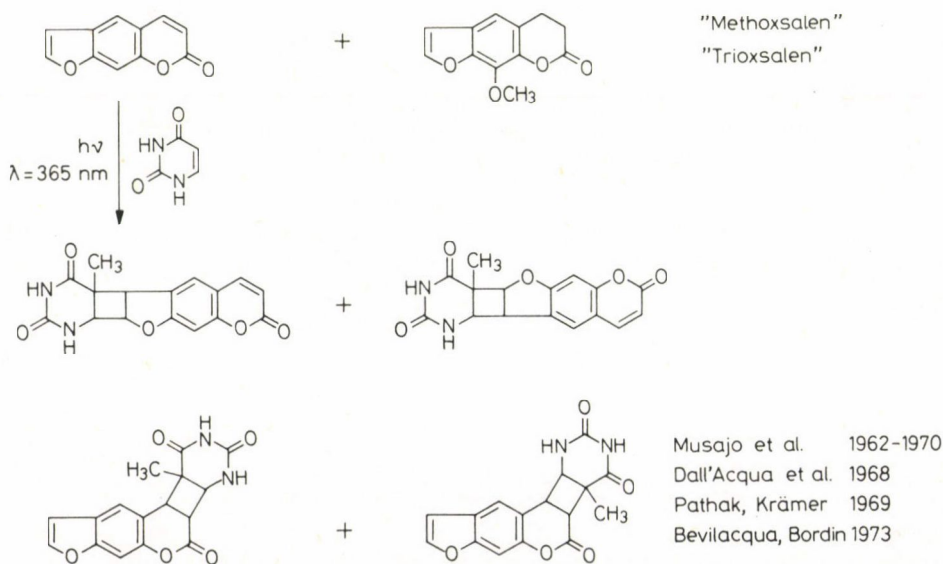
### A fotokemoterápia modellvegyületei és modellreakciói

A szubsztituátlan maleinimidek utóbbi fotoreakciói uracillal értékes első lépést jelentettek új, ilyen típusú bikromofóros molekulák felé, melyek potenciális psoralén tulajdonságokkal rendelkeznek.

A psoralének a heterociklusos 7H-furo[3,2-g]benzopirán-7-on (furo[3,2-g]kumarin) vázas vegyületekhez tartoznak, néhány közülük fotoszenzitiváló ágens. Ezeket a vegyületeket, mint hatékony bőr fotoszenzitiváló ágenseket a régi egyiptomiak ismerték fel, akik ezt tartalmazó gyümölcs és magkivonatokat alkalmaztak századokig a vitiligo [32] kezelésére.

Besugározva 365 nm-en a psoralének kovalensen kapcsolódnak a nukleinsavak pirimidin bázisaival (l. 12. ábra) és úgy mono-, mint bisz adduktok is ismeretesek [33].

Keresztkötéseket is megfigyeltek a DNS szálak között, ha a psoralének, bivalens ágensként működve két különböző DNS szál pirimidin bázisait összekötik a kettős hélixben [34].

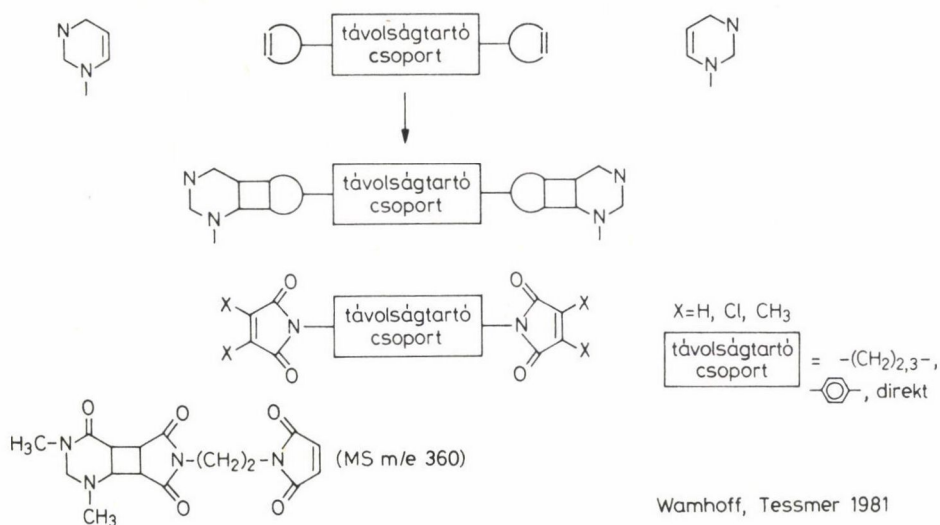


12. ábra. Psoralének fotocikloaddíciói



Az utolsó évtizedben a psoralén (különösen a gyógyszerként alkalmazott 8-metoxipsoralén = „methoxsalén, trioxsalén”) figyelmet keltettek, mint fotokemoterápiás szerek, főleg a psoriasis kezelésében értek el jó eredményeket [4, 35]. Jóllehet, ezeknek a DNS-sel és RNS-sel történő fotoreakcióknak a biológiai velejárói még nem egészen tisztázottak, egy következmény az lehet, hogy az emberi bőrben az epidermális DNS szintézist gátolják [36].

Ezért nem meglepő, hogy az érdeklődés új bifunkcionális és hatékony psoralén-analóg tulajdonságú fotociklofilek keresése felé fordult, a probléma megoldására első próbálkozást a 13. ábrán láthatjuk.



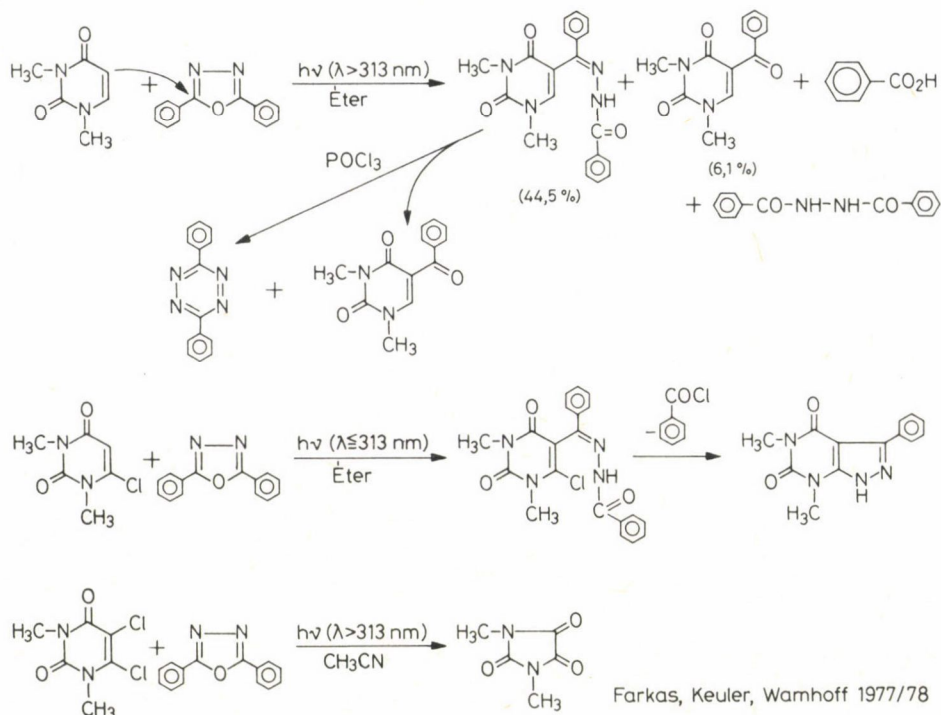
13. ábra. Új psoralén analógok, mint modellvegyületek

Egy ilyen psoralén-analóg modell vegyületnek két hatékony fotociklofil centrummal kell rendelkeznie, melyeket egy megfelelő távolságtartó (spacer) csoport köt össze. UV-besugárzásra kettős (2+2)-fotocikloaddíció játszódik le, s egy psoralénszerű interkalációs addukt keletkezik.

A DXMI-vel sikeres fotoreakciók alapján megpróbáltunk új *bisz*-maleinimideket kifejleszteni megfelelő szubsztituált maleinsavanhidridek és  $\alpha$ - $\omega$ -diaminok reakciójával [37]. De úgy az eddig szintetizált *bisz*-DXMI, mint a *bisz*-MI vegyületek nagyon oldhatatlannak bizonyultak a fotokémiában általában használt oldószerekben, nagyon zsúfolt poláris csoportjaik miatt. De legalább egy esetben sikerült 1:1 fotoadduktot kimutatni a *bisz*-MI és 1,3-DMU között tömegspektrometria segítségével [31]. További munka folyik ebben az irányban kevésbé poláros bikromofórok alkalmazásával.

## Fotoreakciók 1,3,4-oxadiazolokkal

1,3-DMU-val a 2,5-diaril-1,3,4-oxadiazolok, melyek hatékony (2+2)-fotociklofilként ismertek, nem adnak cikloaddíciós reakciót. Helyette gyűrűnyílás történik, melynek eredménye benzoilhidrazonok és melléktermékek [38], amint ezt a 14. ábra mutatja.

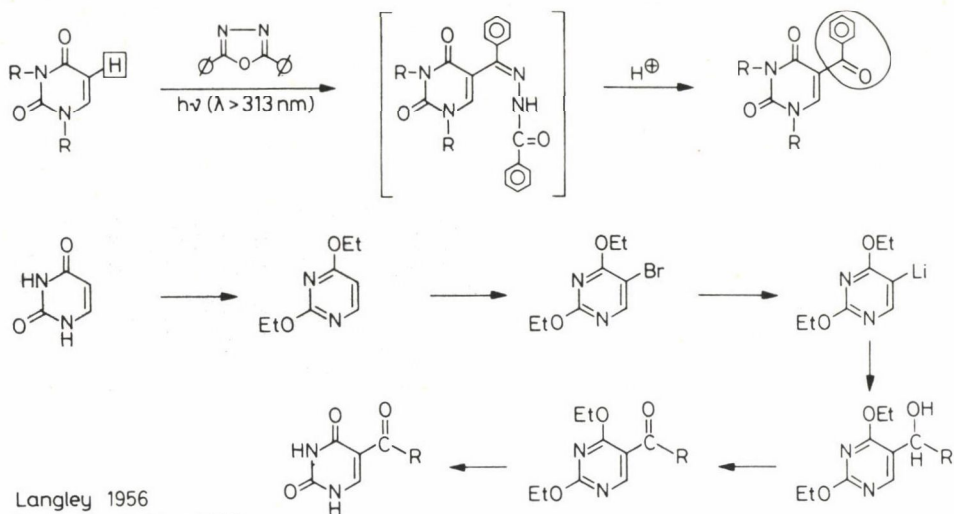


14. ábra. Fotoreakciók oxadiazolokkal

6-Klór-1,3-DMU-val hasonló intermedierek képződnek, de hosszabb besugárzás hatására benzoilklorid eliminálódik, amely új és egyszerű utat nyit purin analógok előállítására, azaz pirazolo[3,4-d] pirimidinek felé (14. ábra).

Ez az érdekes fotoreakció egyszerű és ígéretes eljárásnak szolgálhat 5-benzoil-1,3-DMU előállítására, egy fotoszelektív 5-aroilezési reakciót használva fel (l. 15. ábra) [38].

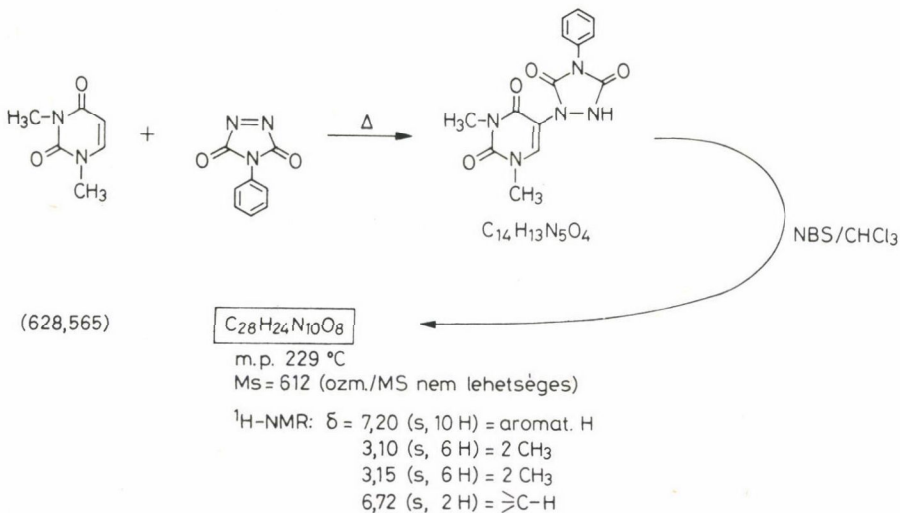
Jelenleg csak kevés, jobbára többlépéses eljárások léteznek az analóg 5-szubsztituált származékok előállítására [39].



15. ábra. Uracilok szelektív 5-benzoilezése

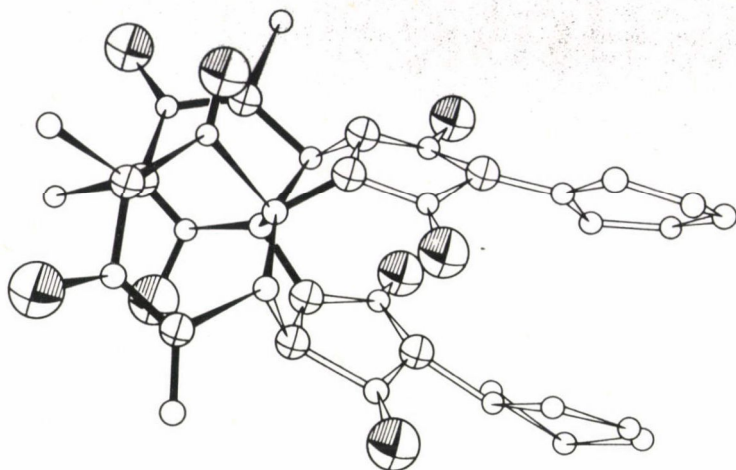
### Egy új uracil kapcsolat

Az utolsó rész két uracilgyűrű új kapcsolási módjával foglalkozik. Az utolsó évtizedben az uracilmolekula számos különböző anellációban, reakciótípusban szerepelt, pl. a fent említett (2+2)-cikloaddíciók,  $6\pi$ -elektron ciklizációk, fotofenantrenizáció [40] és 1,5-elektrociklizáció [41].

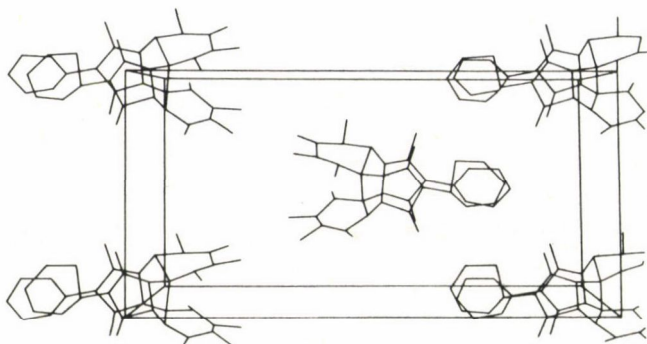


16. ábra. Urazolil-uracil dimerizációja





17. ábra



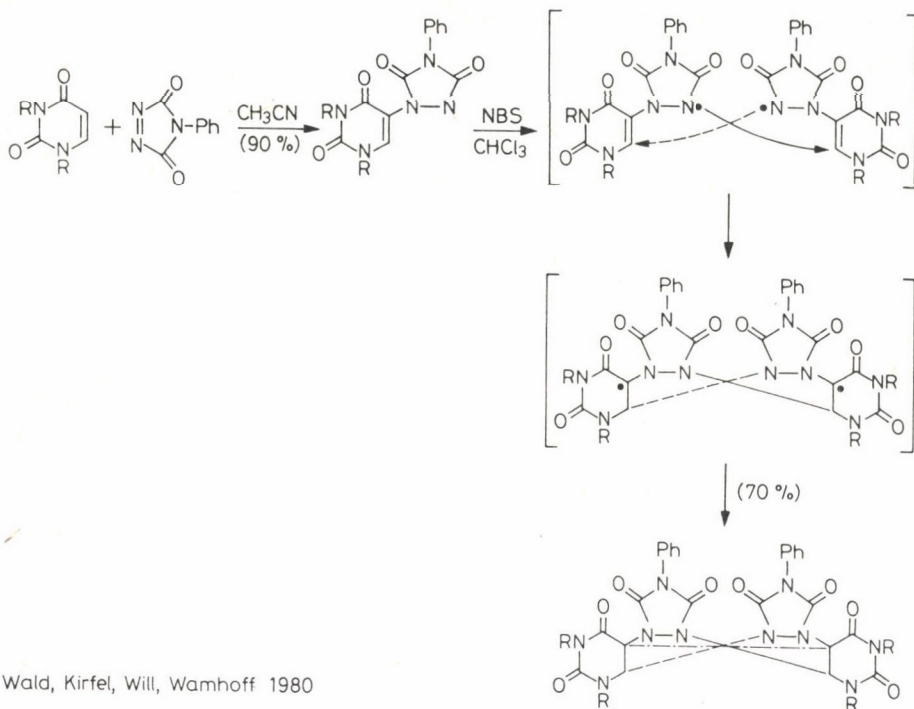
18. ábra

A nagy reaktivitású 4-fenil-1,2,4-triazolin-3,5-dion („4-Ph-TAD”) [42] melegítés hatására az 1,3-DMU 5-ös helyzetében addicionálódik 5-(2-uracil-1-yl)-1,3-DMU-t eredményezve [43]. *N*-Brómszukcinimiddel oxidálva egy új addukt képződik készségesen, melynek összetétele  $C_{28}H_{24}N_{10}O_8$  (16. ábra).

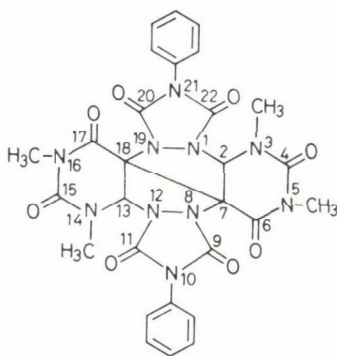
A spektroszkópiai adatok szerint 1 : 1 addukt képződött, melyben két hidrogén kapcsolódik egy tercier szénhez.

A 17. ábra mutatja ennek a molekulának egykristály röntgendiffrakcióval nyert ORTEP rajzát, mely szerint mindkét uracil gyűrű C5 és C5' pozíciója közvetlenül kapcsolódik egymáshoz, és további kapcsolat van a két uracilgyűrű N2 atomja és a szemben levő uracilgyűrűk C6, ill. C6' pozíciói között.

A molekulák elrendeződése a kristályrácsban a 18. ábrán látható, a benzolgyűrűk külön rétegekben helyezkednek el.



19. ábra. Egy új uracil kapcsolás

20. ábra. 3,5,14,16-Tetrametil-10,21-difenil-1,3,5,8,10,12,14,16,19,21-dekaaza 17.0<sup>2,7,0<sup>8,12,0<sup>7,18,0<sup>13,18,0<sup>19,1</sup></sup></sup></sup> hexacyclodokozán-4,6,9,11,15,17,20,22-oktaon</sup>

Ennek a szerkezetmeghatározásnak az alapján a következő reakciómechanizmust javasoljuk, amely gyökös lépések sorozata, amit az alkalmazott N-brómszuccinimid gyökös oxidációja iniciál (19. ábra).

Az urazol gyökös nitrogén atomjának az ellentétes C6 és C6'-re való intermolekuláris támadása után az 5—5' kötés az azt követő rekombinációs lépésben

alakul ki. Tehát, két uracil- és két urazolgyűrű részvételével egy új 8-tagú gyűrű alakul ki egy további C—C kötéssel az 1,2,5,6-tetraazocin gyűrűn keresztül, amint az a 20. ábrán látható [44], egy IUPAC nómenklatúra szabály alapján megkísérelt elnevezéssel [45]. További munka folyik ezen az új és meglepő egyszerű reakciótypus érvényességi körének és határainak felderítésére (20. ábra).

### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁSOK

A szerző nagyon hálás Dr. SZILÁGYI GÉZA, Dr. KLEMENS M. WALD, Dr. FARKAS LAJOS, Dr. JÜRGEN HUPE, és STEFAN TESSMER okl. vegyészek fáradhatatlan és szakavatott közreműködésükért, Dr. SOHÁR PÁL és Dr. FRITZ ZILLIKEN professzoroknak a segítőkész és gondolatébresztő vitáikért, valamint Dr. ARMIN KIRFEL és Dr. GEORG WILL professzoroknak a röntgendiffrakciós vizsgálatokért. A kutatás támogatásáért az Alexander von Humboldt Alapítványnak, az Északrajna-Westphalia tartomány tudomány és kutatásügyi miniszterének, a Fonds der Chemischen Industrie-nak és a BAYER AG.-nak jár köszönet.

### Összefoglalás

Ebben a fejezetben először a pirimidinek ma ismert fotoindukált reakcióit írtuk le; majd dihalomaleimideket és más potenciális fotociklofileket mutatunk be, mint nukleinsavak reakciópartnereit, beleértve a 6-azauracil is. Elektronikus és sztérikus tényezők vizsgálata. Kísérletek a fotoreakciók kiterjesztésére ugyanilyen típusú két kromofóros rendszerekre (psoralén analógok). Végül egy új és meglepően egyszerű kapcsolási módszerről számoltunk be, amelyben két uracil és két 1,2,4-triazolin-3,5-dion kapcsolódik egymáshoz.

### Summary

In this chapter photoinduced reactions of pyrimidines known today are initially described; then dihalomaleimides and other potential photocyclophiles are presented as reaction partners of nucleic acids including also 6-azauracil. Electronic and steric factors are discussed. Furthermore, approaches are shown to extend these photoreactions also to bichromophoric systems of the same type (psoralen analogues). Finally, a novel and surprisingly simple linkage mode of two uracil and two 1,2,4-triazolin-3,5-dione units is reported.

### IRODALOM

1. S. Y. WANG, Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids, Vol. I. Chemistry, Academic Press, New York (1976); E. FAHR, Angew. Chem. 81, 581 (1969); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 8, 578 (1969); P. A. CERUTTI in Houben—Weyl—Müller, Methoden der Organischen Chemie, 4. Aufl., Vol. 4, Part 5b, Thieme, Stuttgart (1975), P.1530 pp.; T. NAKATA, M. TASUMI, DNA Photochemistry, J. Synth. Chem. Japan 32, 419 (1974); I. SAITO, S. ITO, Photochemistry of Nucleic Acid Bases, Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi 36, 1009 (1978) [Chem. Abstr. 90, 98 595d (1979)].
2. Reviews: (a) J. G. BURR, Advan. Photochem. 6, 193 (1968); (b) A. D. McLAREN, D. SHUGAR, Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids, Pergamon, Oxford (1964).
3. R. B. SETLOW, Biochim. Biophys. Acta 49, 237 (1961); R. B. SETLOW, J. K. SETLOW, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48, 1250 (1962); A. A. LAMOLA, J. Am. Chem. Soc. 88, 813 (1966); S. SASSON, D. ELAD, J. Org. Chem. 37, 3164 (1972).
4. D. VELLA BRIFFA, A. P. WARIN, J. Roy. Soc. Med. 72, 440 (1979); G. WEBER, Photochemotherapie, Thieme, Stuttgart 1978; M. A. PATHAK et al., SUNLIGHT, MAN, University of Tokyo Press, Tokyo (1974).



5. Review: G. H. BEAVEN, E. R. HOLIDAY, E. A. JOHNSON in E. Chargaff, J. N. Davidson (eds.), *The Nucleic Acids*, Academic Press, New York (1955), p. 493; J. J. FOX, D. SHUGAR, *Biochim. Biophys. Acta* 9, 369 (1952).
6. W. PFLEIDERER, G. STRAUSS, *Liebigs Ann. Chem.* 612, 173 (1958).
7. J. GUT, M. PRYSTAS, J. JONAS, F. SORM, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 26, 974 (1961).
8. Review: K. C. SMITH, P. C. HANAWALT, *Molecular Photobiology*, Academic Press, New York (1969), p. 62; R. BEUKERS, W. BERENDS, *Biochim. Biophys. Acta* 41, 550 (1960); 49, 181 (1961); R. BEUKERS, J. IJLSTRA, W. BERENDS, *Rec. Trav. Chim.* 79, 101 (1960); S. Y. WANG, *Nature (London)* 188, 844 (1960); G. M. BLACKBURN, R. J. H. DAVIES, *Tetrahedron Lett.* 1966, 4471.
9. R. KLEOPFER, H. MORRISON, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 255 (1972).
10. N. J. LEONARD, R. S. MCCREDIE, M. W. LOGUE, R. L. CUNDALL, *ibid.* 95, 2320 (1973); N. J. LEONARD, R. L. CUNDALL, *ibid.* 96, 5904 (1974); K. GOLANKIEWICZ, B. SKALSKI, *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Chim.* 22, 393 (1974) [*Chem. Abstr.* 81, 120 569 (1974)]; H. KORONIAK, K. GOLANKIEWICZ, *Pol. J. Chem.* 52, 1567 (1978).
11. K. GOLANKIEWICZ, B. SKALSKI, *ibid.* 52, 1365 (1978).
12. S. W. BALDWIN in A. Padwa (ed.), *Organic Photochemistry*, vol. 5, Marcel Dekker, New York (1981), p. 123 pp.
13. E. KRAJEWSKA, D. SHUGAR, *Science* 173, 435 (1971); *Acta Biochim. Polon.* 19, 207 (1972).
14. R. MALESKI, M. MORRISON, *Mol. Photochem.* 4, 507 (1972).
15. J. S. SWENTON, J. A. HYATT, *J. Am. Chem. Soc.* 96, 4879 (1974); J. A. HYATT, J. S. SWENTON, *ibid.* 94, 7605 (1972); J. S. SWENTON, J. A. HYATT, J. M. LISY, J. CLARDY, *ibid.* 96, 4885 (1974).
16. B. A. PEARLMAN, *ibid.* 101, 6398 (1979).
17. A. J. VARGHESE, *Photochem & Photobiol.* 21, 147 (1975).
18. R. BEUGELMANS, J. L. FOURREY, S. D. GERO, M. T. LE GOFF, D. MARCIER, V. RATOVELOMANANA, C. R. Acad. Sci. Ser. C 274, 882 (1972); D. BERGSTROM, W. C. AGOSTA, *Tetrahedron Lett.* 1974, 1087.
19. H. D. SCHARF, H. LEISMANN, *Z. Naturforsch.* 28b, 662 (1973).
20. H. D. SCHARF, F. KORTA, *Chem. Ber.* 98, 764 (1965).
21. H. D. SCHARF, F. KORTE, *Tetrahedron Lett.* 1966, 2033; *Chem. Ber.* 99, 1299 (1966).
22. H. WAMHOFF, H. J. HUPE, *Tetrahedron Lett.* 1978, 125; *Chem. Ber.* 111, 2677 (1978).
23. G. SZILÁGYI, H. WAMHOFF, P. SOHÁR, *ibid.* 107, 1265 (1974).
24. Review: A. PADWA, *Chem. Rev.* 77, 37 (1977).
25. G. SZILÁGYI, H. WAMHOFF, *Angew. Chem.* 92, 1066 (1980); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19, 1026 (1980).
26. G. SZILÁGYI, H. WAMHOFF, *Angew. Chem. and Angew. Chem. Int. Ed. Engl. sajtó alatt.*
27. W. PRUSOFF, *Biochim. Biophys. Acta* 58, 588 (1962); H. GUNTHER, W. PRUSOFF, *ibid.* 49, 361 (1967).
28. G. J. FISCHER, H. E. JOHNS in S. Y. Wang (ed.), *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, Vol. I. Chemistry, Academic Press, New York (1976), p. 255.
29. T. MATSUO, S. MIHARA, *Bull. Chem. Soc. Jpn* 48, 3660 (1975) [*Chem. Abstr.* 84, 104 724q (1976)]; K. M. WALD, A. A. NADA, G. SZILÁGYI, H. WAMHOFF, *Chem. Ber.* 113, 2884 (1980).
30. D. BRYCE-SMITH, *Pure Appl. Chem.* 16, 47 (1968); 34, 193 (1973); D. BRYCE-SMITH, R. R. DESHPANDE, A. GILBERT, J. GRZONKA, *J. Chem. Soc. D* 1970, 562; D. BRYCE-SMITH, M. A. HEMS, *Tetrahedron Lett.* 1966, 1895; W. HARTMANN, H. G. HEINE, L. SCHRADER, *ibid.* 1974, 883, 3101.
31. H. WAMHOFF, S. TESSMER, nem közölt eredmények.
32. V. PERONE, *Microb. Toxins* 8, 711 (1967).
33. L. MUSAJÓ, F. BORDIN, G. CAPORALE, S. MARCIANI, G. RIGATTI, *Photochem. & Photobiol.* 6, 711 (1967); L. MUSAJÓ, F. BORDIN, R. BEVILACQUA, *ibid.* 6, 927 (1967); L. MUSAJÓ, G. RODIGHIERO, *ibid.* 11, 27 (1970); F. S. DALL'ACQUA, S. MARCIANI, F. BORDIN, R. BEVILACQUA, *Ric. Sci.* 38, 1094 (1968) [*Chem. Abstr.* 71, 22 102c (1969)].
34. R. S. COLE, *Biochim. Biophys. Acta* 217, 30 (1970); 30 (1971); M. A. PATHA, D. M. KRÄMER, *ibid.* 195, (1969); R. BEVILACQUA, F. BORDIN, *Photochem. & Photobiol.* 17, 191 (1973).
35. Review and molecular basis: B. R. SCOTT, M. A. PATHAK, G. R. MOHN, *Mutation Research* 39, 29 (1976); J. A. PARRISH, T. B. FITZPATRICK, L. TANENBAUM, M. A. PATHAK, *New England J. Med.* 291, 1207 (1974).
36. J. F. WALTER, J. J. VOORHEES, *Acta Dermatovenereologica (Stockholm)* 53, 469 (1973); J. F. WALTER, J. J. VOORHEES, W. H. KELSEY, E. A. DUEL, *Archives of Dermatology* 107, 861 (1973).
37. E. HEDAYA, R. L. HINMAN, S. THEODOROPoulos, *J. Org. Chem.* 31, 1317 (1966); J. PUT, F. C. DE SCHRYVER, *J. Am. Soc.* 95, 137 (1973); of also F. C. DE SCHRYVER, N. BOENS, J. PUT in J. N. Pitts, G. S. Hammond, K. Gollnick (eds.), *Adv. Photochem.* 10, 359 (1977).

38. L. FARKAS, J. KEULER, H. WAMHOFF, *Chem. Ber.* 113, 2566 (1980).
39. B. W. LANGLEY, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 2136 (1956); T. V. RAJKUMAR, S. B. BINKLEY, *J. Med. Chem.* 6, 550 (1963); H. P. M. THIELLIER, G. J. KOOMAN, U. K. PANDIT, *Tetrahedron* 33, 2603 (1977).
40. R. D. YOUSSEFYEYEH, M. WEISZ, *J. Am. Chem. Soc.* 96, 315 (1974); R. D. YOUSSEFYEYEH, L. LICHTENBERG, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1974, 2649.
41. S. SENDA, K. HIROTA, M. TAKAHASHI, *ibid.* 1975, 503; Review: R. HUISGEN, *Angew. Chem.* 92, 979 (1980).
42. H. WAMHOFF, K. M. WALD, *Org. Prep. Proced. Int.* 7, 251 (1975); lásd még: M. FIESER, L. F. FIESER, *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 6, Wiley-Interscience, New York (1977), p. 75 pp; H. WAMHOFF, G. KUNZ, *Angew. Chem.* 93, (1981); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20, (1981) sajtó alatt.
43. H. WAMHOFF, K. WLAD, *Chem. Ber.* 110, 1716 (1977).
44. K. M. WALD, A. KIRFEL, G. WILL, H. WAMHOFF, *Chem. Ber.* előkészületben.
45. Köszönjük F. VÖGTLE professzornak a szerkezeti hozzárendeléseket és a nomenklatúrára tett javaslatait.

## BIOMOLEKULÁK KONFORMÁCIÓJÁNAK KÍSÉRLETI MEGHATÁROZÁSA CIRKULÁRIS DIKROIZMUSSEL

GÜNTHER SNATZKE

(Lehrstuhl für Strukturchemie, Ruhruniversität D-4630 BOCHUM, Postfach 10 21 46, NSZK)

### Bevezetés

Manapság nagyon könnyen lehet CD-görbéket mérni, de ugyanilyen könnyen hibásan interpretálhatjuk is azokat. Egyik azok közül, melyet majdnem minden tankönyvben megtalálhatunk az a kijelentés, hogy a CD-t felhasználhatjuk az *abszolút konfiguráció* meghatározására; valójában ritkán van erről szó, mert általában csak az abszolút konformációt tudjuk meghatározni (a kromofórét, ha az királis, egyéb esetben a környezetét), és további kiegészítő vizsgálatokra van szükség (NMR, röntgendiffrakció, konformáció-analízis stb.) ahhoz, hogy korrelációba hozzassuk az abszolút konformációt az abszolút konfigurációval.

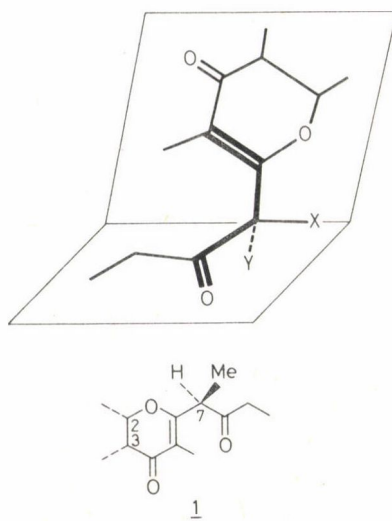
Manapság a CD-vel történő sztereokémiai vizsgálatok céljára több különböző szabály létezik, de nagyon gondosan kell kiválasztani a megfelelőt, vagy ki kell fejleszteni egy saját szabályt, ha egy új kromofórral foglalkozunk, amennyiben megbízható eredményeket akarunk kapni. A CD viszont hasznos lehet néhány más célra a sztereokémiában, és a következőkben három példát mutatunk be; az egyik „konvencionális”, a másik kettő kevésbé az.

### A sztegobinon abszolút konfigurációja

Ezt a feromont a kenyérbogárból (*Stegobium paniceum*) izolálták KUWAHARA és munkatársai [1], kik a CD spektrumot is közölték és megadták a konstitúciót (sztereokémia nélkül), bár a CD-görbe sok információt adott róla. Néhány évvel később HOFFMANN és munkatársai [2] aszimmetriás szintézissel meghatározták a C-2 és C-3 abszolút konfigurációját, de mindig a két 7-epimer keverékét kapták. Később az elválasztás sikerrel járt [3] és mindkét diasztereomert CD-vizsgálatnak vetették alá. A konjugált enon rendszer  $n-\pi^*$  abszorpcióján belül mindkét 7-epimer negatív Cotton-effektust mutatott a szokásos finomszerkezettel; a természetes vegyület egy további erős negatív Cotton-effektust ad 290 nm körül és egy pozitívet 260 nm-nél; a szintetikus 7-epimer esetén az utóbbi két Cotton-effektusnak ellenkező előjele van. A 290 nm-es CD-sáv nyilvánvalóan a telített oldallánc karbonil csoportjának  $n-\pi^*$



abszorpciójához rendelhető, és egy ilyen intenzív CD nagyon jellemző a  $\beta,\gamma$ -telítetlen ketonok speciális geometriájára. Ilyen molekularészlet valóban jelen van a sztegobinon molekulában, a kettős a dihidro- $\gamma$ -piron gyűrű részét képezi. Ez a szükséges geometria az 1. ábrán látható (vastag kötésvonalak): a  $C=C$  és  $C=O$  kötések magábanfoglaló két sík által bezárt szögnek közelítőleg  $100-120^\circ$ -nak kell lennie és a



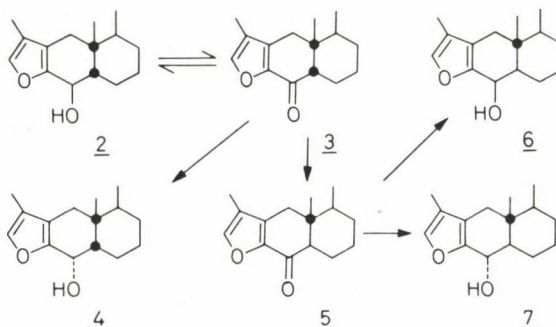
1. ábra. A sztegobinon (1) abszolút konfigurációja és a  $C=C-C-C=O$  molekularészlet abszolút konformációja volt szükséges ahhoz, hogy erős negatív Cotton-effektus lépjen fel 300 nm körül

csatlakozó egyes kötések torziós szögeinek azonos előjelűnek kell lenni (Cahn—Ingold—Prelog konvenció) a  $C=C(R)-C=O$  molekularészben: mindkettő negatív, ha negatív a Cotton-effektus.

Tehát a CD így egyértelműen meghatározza a C-7 körül az abszolút konformációt, de semmit sem mond a C-7 abszolút konfigurációjáról, azaz arról, hogy a hidrogén vagy a metil csoport szűn-periplanáris (X az 1. ábrán) a  $C=O$  csoporthoz képest. Itt segít viszont a konformáció-analízis mivel jól ismert, hogy általában inkább a C—C, mint a C—H kötés kedvezményezett a szűn-periplanáris konformációban. Mindkét információt számításváve úgy a CD, mint a konformáció analízis a (7R)-konfigurációt igazolta a természetes feromon kérdéses királis centrumára (X=Me, Y=H az 1. ábrán). A szintetikus (7S)-epimer röntgendiffrakciós vizsgálata igazolta a konformáció és az abszolút konfiguráció helyességét [3].

## A 9-hidroxi-furoeremofilán C—9 konfigurációja

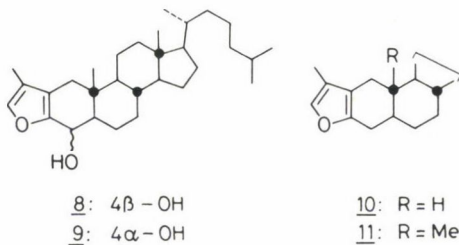
A 9-hidroxi-furoeremofilánt 1969-ben NOVOTNY és munkatársai [4] izolálták a Petasites hybridus rizomájából.

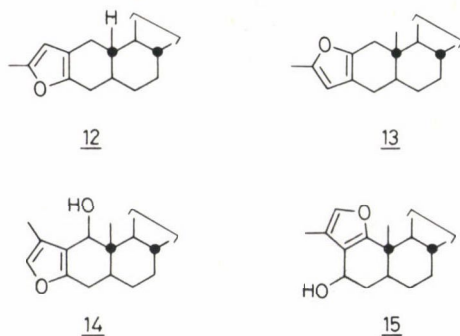


Ez egy allilalkohol származéknak bizonyult, amit 3 ketonná oxidáltak, amely könnyen izomerizál az ismert 5 transz-ketonná. Mindkét keton redukciójával a 2/4, ill. 6/7 epimer alkoholpárok keletkeznek; a transz-anellált rendszerben a hidroxi csoport konfigurációja a  $^1\text{H-NMR}$  spektrumból egyértelműen megállapítható, a természetes alkohol és epimerjének NMR spektruma viszont nem ad egyértelmű eredményeket. Abban az időben a CD spektroszkópia sem segíthetett, mert semmi sem volt ismeretes a furán kromofór kiroptikai sajátságairól. Közben több, mint 60 szteroidális furánt és tiofént szintetizáltunk (dr. Grosserral és Lindnerrel közösen), de mielőtt a természetes 9-hidroxi-eremofilán OH csoportjának sztereokémiájának meghatározására felhasználtuk volna, be kellett bizonyítanunk, hogy

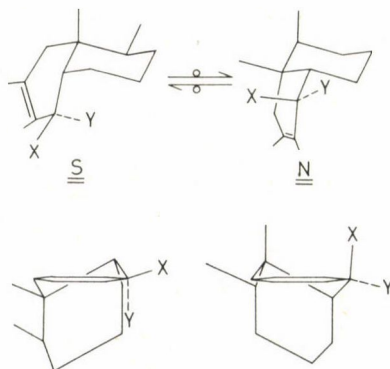
1. szteroidok jól használhatók egyszerű dekalin-származékok helyett ezekre a szeszkviterpenoidokra, és
2. a furán-gyűrűhöz  $\alpha$  és  $\beta$  helyzetű axiális C—C kötések nem változtatják meg drasztikusan a kiroptikai sajátságokat.

A furánok kettő vagy négy Cotton-effektust mutatnak 250 nm alatt, melyek viszont nem mindig különülnek el. Úgy 6 mint a megfelelő szteroid 8 negatív Cotton-effektust mutat 250 és 210 nm között és egy pozitívet rövidebb hullámhossznál; 7 és 9 epimerek ellentétes kiroptikai viselkedésük ugyanebben a hullámhossz tartományban.





Mint várható a két további gyűrűnek, C és D-nek ezért nincs jelentős befolyása. A hidroxifuránoknak ez a viselkedése valamennyire emlékeztet a benzilalkohol típusú vegyületekére, mint pl. 1-hidroxitetralinokéra. Általában (diskussziót l. [5]-ben) a benzol kromofórhoz anellált ciklohexén gyűrű helicitása (a „királis második szféra”) határozza meg az egyes Cotton-effektusok előjelét és ez a szabály nem változik meg egy (pszeudo)ekvatoriális hidroxici csoport jelenlététől a C-1 pozícióban. Egy (pszeudo)-axiális OH ugyanitt viszont megfordítja néhány Cotton-effektus előjelét. A 6 axiális alkohol konformációja a mi „szokásos vetületünkben” (a ciklohexén  $C_2$  tengelye mentén, a furángyűrűtől távolodva) hasonlít az N-re a 2. ábrán ( $X=OH$ ,  $Y=H$ ), míg 7 hasonló projekciójában az OH-t és H-t fel kell cserélni.



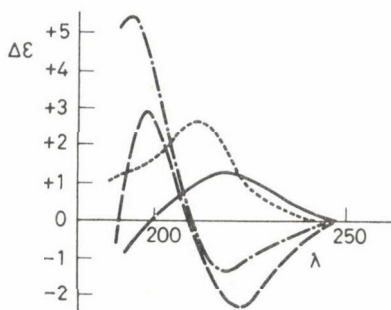
2. ábra. A furoeremofilán *cisz*-oktalin rendszerének szteroid-szerű (S) és nem szteroid-szerű (N) konformációja. A furánnak csak egy kettőskötését ábrázoltuk. Mindegyik sztereoformula alatt a hozzátartozó „szokásos vetületeket” mutattuk be, azaz a ciklohexén  $C_2$  tengelye mentén a furángyűrű felől nézve. Az X-szubsztituens C-9-en a rendszer  $\beta$ -oldalán van, az Y az  $\alpha$ -oldalán

Hogy megvizsgáljuk egy axiális C—C szubsztituens befolyását, összehasonlítottuk, pl. a 10 19-norszteroid CD spektrumát a 11 vegyületével; mindkettő két pozitív Cotton effektust mutat 200 nm fölött és egy gyengén negatívot 200 nm alatt. Hasonló eredményeket találtak ilyen homológok más párjaira is. Egy axiális C—C kötés

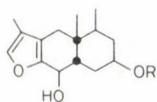


befolyását a másik, minket érdeklő pozícióban a 12/13 és 14/15 párokon vizsgáltuk. Jogosan feltételezve, hogy a 12 és 13 vegyületekben az A gyűrű ugyanolyan félszék formációban van, az A és B gyűrűk királis perturbációja a furán kromoforra ugyanaz ezekben a vegyületekben és csak az axiális metil csoport jelenléte, ill. hiánya az egyedüli különbség. 12 pozitív CD-t ad 240 nm körül, pozitív minimumot ad 225 nm-nél, egy másik pozitív maximum található 210 nm körül és negatív Cotton-effektus jelentkezik 200 nm alatt. A 13 CD görbéje hasonló, de a 225 nm-es negatív Cotton-effektus sokkal erősebb, így ez kifejezett negatív CD-maximum, másrészt a 200 nm alatti negatív Cotton-effektus csak egy pozitív minimumként jelentkezik. Végül a 14/15 pár A gyűrűi enantiomer viszonyban vannak egymással és a két vegyület CD görbéi enantiomorf típusúak (a hosszútól a rövidebb hullámhosszak felé haladva 14-nél negatív, pozitív és pozitív, míg 15-nél pozitív, negatív és megint negatív a sorrend). Az OH-csoport jelenléte a kromofór mellett (természetesen enantiomer pozíciókban is), egyértelműen sokkal nagyobb hatást gyakorol, mint a 19-metil jelenléte vagy hiánya, ezekre a CD-görbékre. Tehát a szteroid modellek hasznossága bebizonyosodott.

A 2 és 4 *cisz*-oktalin rendszer akár a sztereoid-szerű (S, a B gyűrűre axiális anguláris metil) vagy a nem sztereoid-szerű konformációt (N, A gyűrűre axiális anguláris metil) veheti fel (l. 2. ábra). Vegyületeink segítségével megmutattuk, hogy az N projekciójú molekula (X=OH, Y=H) negatív CD-hez vezet 250 és 210 nm között és egy rövidebb hullámhosszú pozitívhoz [előjel sorrend „+(-)”, míg az N (X=H, Y=OH) enantiomorf CD görbét ad („-/+”). Az N/S párban az A gyűrűk enantiomer viszonyából következik, hogy az S (X=OH, Y=H)-nek olyan Cotton-effektusokat kell adniuk, melyek N (X=H, Y=OH) tükörképei, azaz „-/+”, és analóg módon S-nek (X=H, Y=OH) „+/-” előjel sorrendet kell adnia. Ez az összehasonlítás azt mutatja, hogy a 9 $\beta$ -hidroxi eremofilánnak (X=OH, Y=H) „-/+” formájú CD-t kell adnia, függetlenül a *cisz*-oktalin rendszer konformációjától, míg epimerjének „+/-” alakú CD-t kell adnia. A CD-ből következik, hogy a természetes 9-hidroxi-furoeremofilánnak 9 $\beta$ -konfigurációjúnak kell lennie. A CD itt formálisan függetlennek tűnik a konformációtól! A CD görbéket a 3. ábrán mutatjuk be.



3. ábra. A természetes 9 $\beta$ -hidroxi-furoeremofilán (2: ----) és 9-epimerje 4 (—), valamint a furanopetazol (16: -.-.-) és a furanopetazin (17: ..... ) CD görbéi

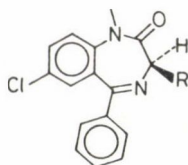


16: R = H

17: R = angeloyl

Egy másik rokon szeszkviterpenoid észter, a furanopetazolin 17 CD-je szintén nagyon tanulságos (3. ábra). Az NMR-ből következik, hogy a B gyűrű mindkét szubsztituense ekvatoriális konformációjú, így a rendszer S-konformációban rögzített. Szintén tartalmaz  $9\beta$ -hidrox csoportot, mégis a CD görbéje teljesen eltérő a 2 CD-jétől. Nyilvánvalóan a királis kölcsönhatás a furán kromofór és az angeloil oldallánc között az, amely a szokatlan Cotton-effektushoz vezet, mert a megfelelő diol furanopetazolin (16) ugyanezt az előjel sorrendet „-/+” adja, mint a  $9\beta$ -hidroxifuroeremofilán (2). 17 egy újabb példa, amelyben egy akirális abszorbeáló szubsztituens drasztikusan megváltoztatja a fő kromofór rendszer kiroptikai sajátságait.

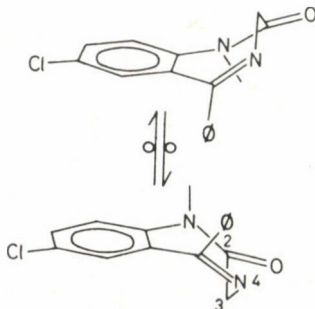
### HSA-hoz kötött diazepam



18: R = H

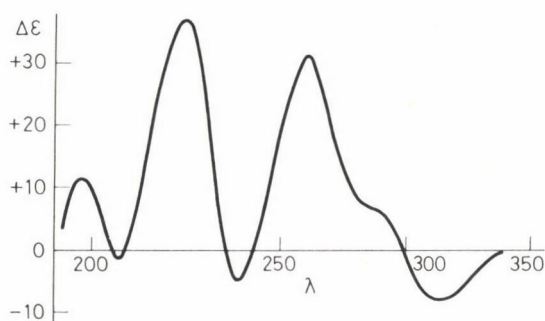
19: R = Me

A diazepam (18) optikailag inaktív vegyület, de molekulái egyáltalán nem akirálisak: amint ezt molekulamodelleken láthatjuk és több származék röntgendiffrakciós vizsgálata is igazolta, hogy a heterociklusos gyűrű két enantiomer királis konformációja közül csak egyiket veheti fel (4. ábra), így valójában ez a vegyület racemátot képez (mint pl. a tetralin is!). A heterociklusos gyűrű inverziógátja néhány



4. ábra. Az optikailag inaktív diazepam két lehetséges királis konformációja. Ø fenilt jelent. A felső molekula konformációja a 2—3 és 3—4 kötések mentén M, az alsón P (Cahn—Ingold—Prelog-konvenció). Az optikailag aktív származékok a 3-as pozícióban szubsztituáltak

ilyen vegyület DNMR méréséből ismert; a szubsztituátlan diazepam (18) esetén ez nem elég nagy ahhoz, hogy meggátolja a gyűrűinverziót szobahőmérsékleten, így az M és P forma (l. 4. ábra) termikus egyensúlyban van az oldatban. C-3 pozícióban a monoszubsztitúció stabilizálja valamelyik konformációt, mivel a szubsztituens nem irányulhat a „gyűrűbe” és a (3R)-konfiguráció esetén csak a gyűrű P-konformációja lehetséges (19). Az L-alaninból előállított (3S)-izomer (19 enantiomerje, R = Me) CD görbáját az 5. ábrán mutatjuk be. Általában 8 nagyon erős Cotton-effektust figyeltünk meg [7]; a második (300 nm alatt) rendszerint csak vállként jelenik meg a harmadikon, a 4. és 6. gyakran nem elkülönülő maximumként jelentkeznek, hanem inkább mint éles minimum (ellenkező előjellel). Az első négy sávon belül a CD-t nem empirikus úton magyarázhattuk [8], de a humán szérum albuminhoz (HSA) kötött 18 kedvezményezett konformációját meghatározhatjuk anélkül, hogy a sávok asszignációját elvégeznénk.



5. ábra. A (3S)-3-metil diazepam CD görbéje (19 enantiomer formulája)

Az abszorbanciával analóg módon,  $A = \log(I_0/I)$ , amely arányos az abszorpciós koefficienssel,  $A = \epsilon cd$  ( $c$  = koncentráció mól/l-ben;  $d$  = fény úthossz cm-ben) és a keverékekben additív, definiálták a differenciális abszorbanciát  $\Delta A = A_L - A_R$ , ahol L a balra, R a jobbra cirkulárisan polarizált fényt jelenti. Ez a mértékérték a CD-vel egyszerűen korrelációba hozható:

$\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = \Delta A / cd$ , teljes analógiában az  $\epsilon$  definíciójával és az elegyekre a  $\Delta A$  értékek szintén additívek. Legyen  $c$  a diazepam (18) koncentrációja, és oldatban az M és P formák aránya 1 : 1,  $c_M = c_P$ . Ha 18 HSA-hoz kötődik, akkor a szabad HSA és szabad 18 mellett a HSA-M és HSA-P komplexek is jelen lesznek és a koncentrációik viszont már nem lesznek egyenlőek diasztereomer kapcsolatuk miatt. Adott körülmények között gélfiltrációs kísérletekből meghatároztuk, hogy a diazepamnak közelítőleg 56%-a kötődik a HSA-hoz [7], így

$$c(\text{HSA} - \text{M}) + c(\text{HSA} - \text{P}) = 0,56 c(18) \quad (1)$$

Az oldatban a szabad 18 nem okoz problémát, mivel CD-t nem mutat (az „oldószer-indukált” CD, amit az optikailag aktív, vízben oldott HSA okoz, túl kicsi ahhoz, hogy mérhessük) és a HSA nem ad adszorpciót 300 nm felett. Így, ha csak a



hosszú hullámhosszú Cotton-effektusra koncentrálnak, a HSA sem fog zavarni. A kötött 18 kétféleképpen adhat CD-t: először is lehet, hogy csak egy konformációban kötődik, ekkor ugyanolyan Cotton-effektusokat várnánk, mint amilyeneket az optikailag aktív származékok esetén figyeltek meg, másodszor a HSA „környezet” mint perturbáló közeg hat a 18 azon molekuláira, melyek kötődve vannak. Tapasztalatból tudjuk, hogy ilyen indukált CD-effektusok általában nem nagyon erősek, úgyhogy ezeket elhanyagolhatjuk, ha összehasonlítjuk a 18 egy királis konformációjához tartozó saját Cotton-effektusaival.

Hasonló módon egy 3-szubsztituált optikailag aktív diazepam származéknak, mint 19 vagy enantiomerjének  $E-19$  a CD-je néhány tényezőtől tevődik össze, a legnagyobb a belső királis kromofórnak tudható be; a közeli 3-as szubsztituensnek a kromoforra gyakorolt királis perturbációja legalább két nagyságrenddel kisebbnek várható. A 3-as szubsztituens konfigurációja tehát csak közvetve határozza meg a CD-t úgy, hogy csak egy konformációt tesz lehetővé az oldatban. Számításba véve az előbb említett korrelációt, az abszolút konformáció és abszolút konfiguráció között, felírhatjuk, hogy  $\Delta\epsilon_M = \Delta\epsilon_S$  és  $\Delta\epsilon_P = \Delta\epsilon_R$ , ahol M és P alsó indexek a héttagú gyűrű konformációjára utalnak, ahogy korábban definiáltuk, és R, valamint S a C-3 konfigurációjára utal (R = alkil).

A CD mérések, melyeket ugyanolyan körülmények között végeztünk, mint a gelsűrítési kísérleteket, nagyon erős CD sávokat adtak, melyek még így is csak kb. az optikailag aktív  $E-19$  50%-a, ha egyenletbe írjuk  $c(E-19)$ -t a  $c(18)$ -cal, azaz,

$$\Delta A/d = \Delta\epsilon_M c(\text{HSA} - M) + \Delta\epsilon_P c(\text{HSA} - P) = 0,5 \Delta\epsilon_S c(18).$$

A hosszú hullámhosszú Cotton-effektusokra felírhatjuk, ha számításba vesszük, hogy  $\Delta\epsilon_R$  azonos  $-\Delta\epsilon_S$ -sel:

$$c(\text{HSA} - M) - c(\text{HSA} - P) = 0,5 c(18). \quad (2)$$

Az (1) és (2) egyenletek összehasonlítása azt mutatja, hogy  $c(\text{HSA} - M)$  egyhez közelít, ebből az következik, hogy az optikailag inaktív 18 kötődik kizárólagosan vagy legalábbis főleg M-konformációban a humán szérum albuminhoz.

#### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁSOK

Szeretném megköszönni a gondos méréseket feleségemnek, dr. F. SNATZKENnek és U. WAGNER úrnak, sok modell vegyület szintézisét dr. R. GROSSERnek és W. LINDNER okl. vegyésznek és többi kollegámnak, hogy mintákat bocsátottak rendelkezésemre és a Fonds der Chemischen Industrie és a Deutsche Forschungsgemeinschaft pénzügyi támogatását.

#### Összefoglalás

Cirkuláris dikroizmussal meghatároztuk a sztegobinon feromon abszolút konfigurációját, a természetes 9-hidroxifuroeremofilán OH csoportjának konfigurációját és a HSA-hoz kötött diazepam (optikailag inaktív) abszolút konformációját.

## Summary

Circular Dichroism is used to determine the absolute configuration of the pheromone stegobinone, the configuration of the OH-group in natural 9-hydroxid-furoeremophilan, and the absolute conformation of (optically inactive) diazepam when bound to HSA.

## IRODALOM

1. Y. KUWAHARA, H. FUKAMI, R. HOWARD, S. ISHII, F. MATSUMURA, W. E. BURKHOLDER, *Tetrahedron* **34**, 1769 (1978).
2. R. W. HOFFMANN, W. LADNER, *Teir. Let.* **1979**, 4653.
3. R. W. HOFFMANN, W. LADNER, K. STEINBACH, W. MASSA, R. SCHMIDT, G. SNATZKE, *Chem. Ber.* **114**, 2786 (1981).
4. L. NOVOTNY, Z. SAMEK, J. HARMATA, F. SORM, *Coll. Czechoslov. Chem. Comm.* **34**, 336 (1969).
5. A diszkussziót l. G. SNATZKE, M. KAJTÁR, F. SNATZKE ref. (6), p. 148. alatt.
6. F. CIARDELLI, P. SALVADORI (Eds.), *Fundamental Aspects and Recent Developments in ORD and CD*, Heyden, London (1973).
7. T. ALEBIĆ-KOLBAH, F. KAJFEŽ, S. RENDIĆ, V. ŠUNJIĆ, A. KONOWAL, G. SNATZKE, *Biochem. Pharmacol.* **28**, 2457 (1979); — A. KONOWAL, G. SNATZKE, T. ALEBIĆ-KOLBAH, F. KAJFEŽ, S. RENDIĆ, V. ŠUNJIĆ, *ibid.* **28**, 3109 (1979).
8. N. BLAŽEVIC, F. KAJFEŽ, A. KONOWAL, A. SABLJIĆ, F. SNATZKE, G. SNATZKE, V. ŠUNJIĆ, *Croat. Chim. Acta*, sajtó alatt.



## tRNS AMINOACILEZÉSE — MENNYIRE MEGBÍZHATÓAN MŰKÖDNEK AZ ENZIMEK?

F. CRAMER, F. VON DER HAAR, H. STERNBACH, H. J. GABIUS,  
E. GRAESER, G. WEHMEYER, W. FREIST

(Max Planck-Institut für experimentelle Medizin, Hermann-Rein-Strasse 3, D-3400 Göttingen, NSZK)

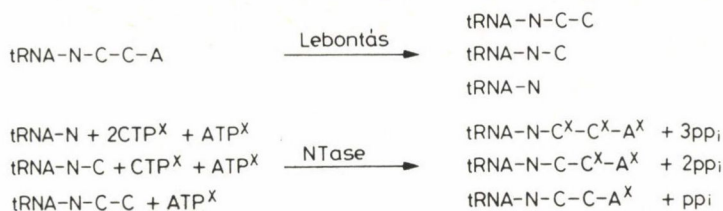
### Bevezetés

A tRNS megfelelő aminosavval történő helyes aminoacilezése kulcsreakció a fehérje bioszintézisében, melynek során az adott aminosavnak egy adott triplett felel meg. A tRNS-nek aminosavval történő aminoacilezésének megbízhatósága ezért az egész átmásolás szempontjából meghatározó jelentőségű. A két partner közötti helyes kapcsolódásnál a tRNS felismerése talán nem olyan kényes, mivel ez egy speciális makromolekula. Másrészt az aminosav felismerése valószínűleg sokkal nehezebb, mivel az aminosavak legtöbbjének hasonló funkciós csoportjai vannak. A végső fehérje működése természetesen az aminosavak helyes elrendeződésétől függ. Ha ezer közül egy hibás lenne, egy ezer aminosav lánchosszúságú fehérje már átlagosan egy hibás elemet tartalmazna. A hibamentes végtermék képződést egy különleges javító-olvasó mechanizmus biztosítja, ez képezi a jelen előadás tárgyát.

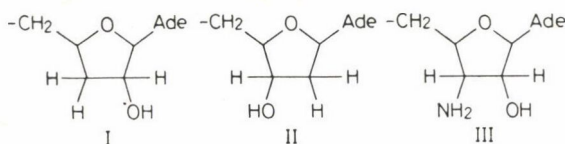
### Módosított tRNS-ek

Az aminoacilezés mechanizmusának vizsgálatára sokoldalúan használhatók a módosított, C—C—A végű tRNS származékok. Használatuk lényeges feltétele az, hogy a tRNS-et egyöntetűen tudjuk módosítani. A módosított tRNS-ek kémiai vagy enzimatisz szintézissel állíthatók elő. AMP és CMP analógok tRNS-be történő beépítése céljából a tRNS molekulát 3'-végénél kémiai és/vagy enzimatisz lebontással lépcsőzetesen rövidíteni kell. Azokat a lerövidített tRNS-ek melyekben részlegesen, vagy teljesen hiányzik a C—C—A rész az ATP(CTP)-tRNS nukleotidiltranszferázon keresztül a CMO és az AMP vagy ezek analogonjaik beépítésével regenerálhatók. Ez az enzim a CTP és az ATP módosítását elviseli [1]. A módosított nukleozid trifoszfát beépülése [2] ezért számos a 3'-végén módosított tRNS specieshez vezet (1. séma). A C—C—A vég alapvetően fontos az aminoacil-tRNS szintetázszal történő aminoacilezésnél, elvben az aminosav a 3'-terminális adenzin két hidroxil csoportja közül bármelyiket megészterezheti. Az, hogy a 2' és 3' hidroxil csoportok közül kezdetben melyik észtereződik nem határozható meg, mivel az aminosav rész a cisz-vicinális hidroxil csoportok között gyorsan át tud vándorolni. Ha a 3'-terminális adenzint 3'-





1. séma. Lebontás:  $\text{NaIO}_4$ -es oxidációval kémiai, lizinnel történő elimináció, foszfatáz kezelés. ATP(CTP)-vel regenerálás: tRNS nukleotidiltranszferáz (NTase); CTP\* = citidin trifoszfát vagy ennek analógja; ATP\* = adenzin trifoszfát vagy analógja



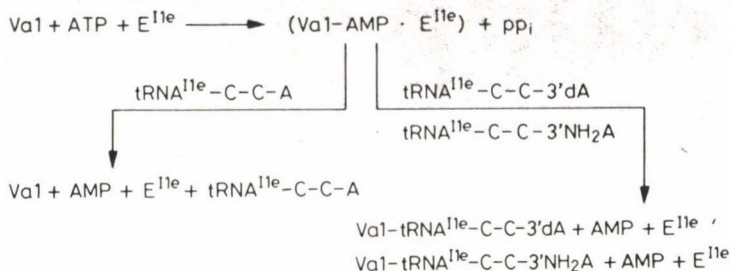
1. ábra

deoxiadenozinnal (I) vagy 2'-deoxiadenozinnal (II), illetve 3'-deoxi-3'-aminoadenzinnal (III) helyettesítjük, lehetőséget kapunk arra, hogy az aminoacilezés mechanizmusát részletesebben tanulmányoztuk (1. ábra). A cisz-diol funkciós csoport hiánya kizárja az aminosav rész izomerizációjának lehetőségét, az utóbbi módosítással viszont egy stabilis amid kötés keletkezik a 3' amino csoport és az aminosav között, ez a hidrolízist meggátolja és így az aminosavat egyértelműen a 3' pozícióban rögzíti.

### Javító-olvasás

A legtöbb aminoacil-tRNS szintetáz a tRNS molekula két 3'-terminális hidroxil csoportja közül kitüntetett valamelyiket. A törzsfajlás során úgy tűnik megmaradt az, hogy az aminosav a 2' és 3' hidroxilok közül melyikhez kötődik (1. táblázat). Olyan módosított tRNS-sel végeztünk vizsgálatokat, melyekben a 3'-terminális ribóz-hidroxil csoportok közül valamelyik hiányzik [3]. Az első lépésben nem aminoacilezett hidroxilcsoport hiánya nem akadályozza meg az észtereződést. Ez meglehetősen váratlan eredmény, különösen ha figyelembe vesszük, hogy a ribózbán a 2'3' hidroxilok közötti izomerizáció igen gyors. Miért veszi a természet azt a fáradságot, hogy csak az egyik hidroxil csoporton támad, ha egy mikromásodperccel azután, hogy az aminoacil-tRNS elhagyta az enzimet aminoacil izomerizáció következik be?

A tRNS aminoacilezése két lépéses reakció. Először az ATP aktiválja az aminosavat és aminoacil-AMP keletkezik (2. séma). A tRNS nélkül végbemenő reakció nem nagyon specifikus. A kérdést részletesen tanulmányoztuk izoleucin enzim és az izoleucinra emlékeztető valin aminosav esetében. Normál körülmények között



2. séma. Javító-eljárás: A tRNS 3'-terminális ribóz módosításának hatása a tRNS téves acilezésére. A hiányzó 3'-OH téves valilezést okoz

### 1. táblázat

Különböző forrásból származó aminoacil-tRNS szintetázal végzett tRNS aminoacilezésének kezdeti támadási helye

Aminoacil-tRNS	Az észterezés helye a kiinduló lépésben		
	Az enzim származási helye		
Szintetáz enzim specifikus	<i>E. coli</i>	élesztő	borjúmáj
Izoleucinra	2'	2'	2'
Leucinra	2'	2'	2'
Metioninra	2'	2'	2'
Fenilalaninra	2'	2'	2'
Treoninra	3'	3'	3'
Tirozinra	2', 3'	2', 3'	2', 3'
Valinra	2'	2'	2'

izoleucil-tRNS szintetáz enzimmal a valin aktivizálható. Ha a rendszerhez módosítatlan C—C—A végű tRNS<sup>11e</sup>-t adunk a valil-AMP azonnal hidrolizálódik, míg a tRNS<sup>11e</sup>-C-C-3'dA tévesen valileződik [4]. Ezekből az eredményekből az az egyetlen lehetséges következtetés vonható le, hogy a tRNS reakcióban részt nem vevő 3'-OH végcsoportjának önmagában is hidrolizáló szerepe van, vagy az aminoacil-tRNS szintetáz segítségével egy korrigáló hidrolízist vált ki, ha az aktivált aminosav helytelen, más szóval: kémiai javító-olvasás megy végbe [5].

Mennyi az ellenőrző-olvasás hozzájárulása a folyamat teljes megbízhatóságához? Ezt tRNS<sup>11e</sup>-C-C-3'-NH<sub>2</sub>A segítségével mértük ki. Ez a tRNS a kémiai ellenőrző mechanizmus belépése nélkül tévesen valilezhető [6, 7]. Ugyanis 3'-OH 3'-NH<sub>2</sub>-vel történő helyettesítése az első lépésben fogadó 2'-OH-tól kiindulva megengedi az izomerizációs transzacilezést, ennek során olyan stabilisabb amid képződik, melyet az ellenőrző-olvasási mechanizmus nem tud elhidrolizálni. Így a tRNS<sup>11e</sup>-C-C-3'-NH<sub>2</sub>A alkalmazása lehetővé teszi, hogy megmérjük, hogyan versenyez a téves valilezés a szabályos izoleucinnal történő acilezéssel (2. táblázat).

A táblázat adataiból látható, hogy a rossz aminosav 200-szoros feleslege a helyes aminosav beépülését 50%-ra csökkenti. Ez azt jelenti, hogy az izoleucin 220-szor jobb



2. táblázat

tRNS-C-C-3'NH<sub>2</sub>A állandó mennyiségű <sup>14</sup>C-izoleuccinnal történő izoleucin-nezése növekvő valin koncentráció mellett

[ <sup>14</sup> C]-Izoleucin (mM)	Valin (nM)	Valin/Izoleucin	Izoleucilezés (%)
0,02	0	0	100
0,02	0,2	10	96
0,02	1	50	80
0,02	2	100	67
0,02	3	150	56
0,02	4	200	50

szubsztrát mint a valin. Ez a hiba csak az enzim Michalis—Menten-mechanizmusán alapul és nagyságrendileg megegyezik a De Maeyer [8] által elméletileg számított értékkel. A javító-olvasási folyamat hatásfoka a következőképpen mérhető: Minden egyes ellenőrző-olvasási lépés és valin visszanyerés egy molekula ATP-t fogyaszt. Ha mérjük egyrészt az ATP fogyasztást és másrészt a kis mennyiségben nem módosított tRNS-ből keletkező valil-tRNS<sup>Ile</sup>-t az ellenőrző olvasás hatékonysága meghatározható. A kis mennyiségben keletkező valil-tRNS<sup>Ile</sup>-C-C-A EF—T<sub>u</sub> segítségével megfogható és a további hidrolizistól megvédhető. A kísérlet tanúsága szerint az élesztő rendszerben valil-tRNS<sup>Ile</sup>-C-C-A mólonként 800 mol ATP fogy [9]. A vizsgált élesztő rendszerben tehát a valin választás izoleuccinnal szembeni teljes hibaaránya 1 a 225 × 800-hoz, azaz 1 a 180 000-hez. Ezzel szemben az *E. coli*-ból származó izoleucil-tRNS szintetáz esetében 270 ellenőrző-olvasásonként 1 valilezést találtak [10]. Más szóval az *E. coli* enzimtől származó ellenőrző-olvasási mechanizmus négyszer kevésbé hatékony, mint az élesztő enzimé. Ez arra utalhat, hogy az ellenőrző-olvasási eljárás a törzsfejlődés során javult.

Az ellenőrző-olvasási mechanizmus változásainak és különbségeinek vizsgálata céljából vizsgálatainkat emlős rendszerekre is kiterjesztettük. Ismeretes, hogy leucint, metionint, tirozint a süttölesztőből származó fenilalanil-tRNS szintetáz tévesen aktiválja [7]. A téves aktiválás során keletkezett AMP mennyiségét összehasonlítottuk élesztő enzim [1] és a pulykamájából származó fenilalanil-tRNS szintetáz megfelelő adataival (3. táblázat) [19].

A pulykamájából származó enzim jellegzetes különbségeket mutat. Ezzel az enzimmal a tirozin aktiváltsága a leucin és metioninhoz képest alig mérhető. tRNS<sup>Phe</sup>-C-C-3'NH<sub>2</sub>A-val egyik tévesen aktivált aminosav sem észterezhető, de a leucin és metionin aktiválása során az AMP képződés következtében keletkező aminosavakat a rendszernek fel kell dolgoznia.

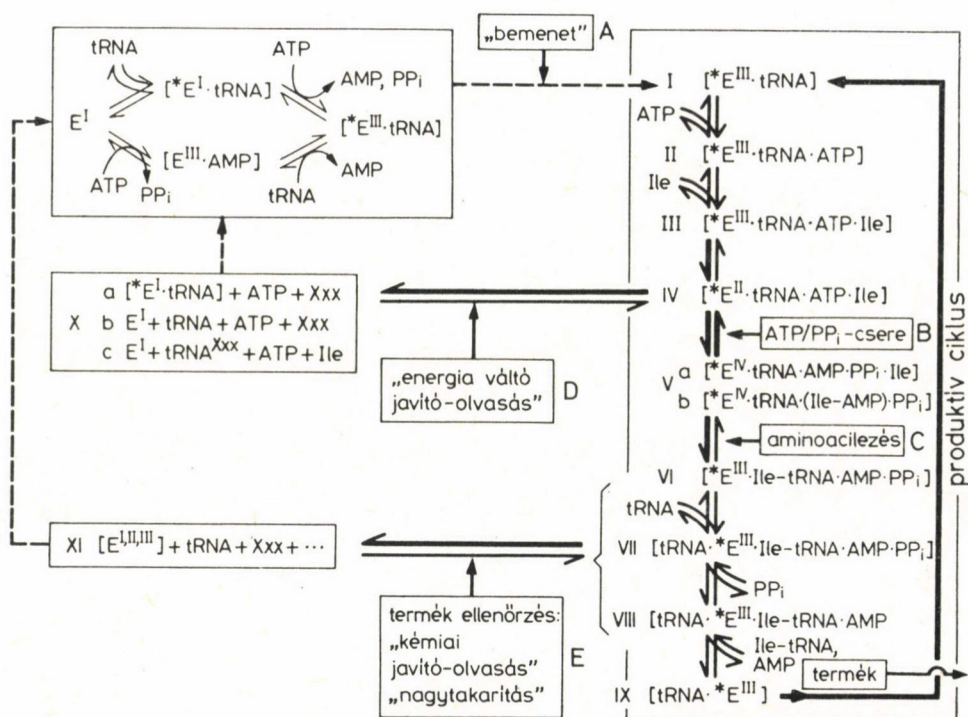
Újabb vizsgálataink szerint az élesztőből származó szintetáz nem-folyamatszerűen egy mol ATP-t használ fel. Nyilvánvalóan ennek a molekulának az a szerepe, hogy az enzimet nagyobb megbízhatóságú állapotba hozza. Eredményeink alapján [12] az enzim négyféle állapotát tételezhetjük fel (3. séma). Ez az elv az ellenőrző-



3. táblázat

Sütőélesztőből (I) és pulykamájából (II) származó fenilalanil-tRNS szintetáz jelenlétében történő,  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}\text{-C-C-N}$ -függő  $[^{14}\text{C}]\text{AMP}$  képződés;  
 $k_{\text{kat}}(\text{min}^{-1})$

Enzim tRNS jelenlétében	Leu	Met	Tyr
I tRNS nélkül	0,05	0,05	0,05
II tRNS nélkül	0,75	1,35	0,1
I $\text{tRNS}^{\text{Phe}}\text{-C-C}$	0,05	0,05	0,05
II $\text{tRNS}^{\text{Phe}}\text{-C-C}$	0,80	1,60	0,1
I $\text{tRNS}^{\text{Phe}}\text{-C-C-3'dA}$	0,1	0,1	0,1
II $\text{tRNS}^{\text{Phe}}\text{-C-C-3'dA}$	0,64	1,13	0,1
I $\text{tRNS}^{\text{Phe}}\text{-C-C-A}$	0,64	2,03	6,80
II $\text{tRNS}^{\text{Phe}}\text{-C-C-A}$	2,93	3,62	0,31
I $\text{tRNS}^{\text{Phe}}\text{-C-C-2'dA}$	0,05	0,05	0,05
II $\text{tRNS}^{\text{Phe}}\text{-C-C-2'dA}$	2,50	3,57	0,27



3. séma. Az izoleucil-tRNS szintetáz hatás közbeni lépéseinek javasolt vázlata. (E izoleucil-tRNS szintetáz,  $E^I$ ,  $E^{II}$ , ... különböző energiatartalmú enzimállapot, \*E tRNS komplexálás következtében megnövekedett megkülönböztető képességű enzimzet jelent; tRNS izoleucin tRNS-t jelent,  $\text{tRNS}^{\text{Xxx}}$  bármilyen másik tRNS-t jelez, Ile izoleucin, Xxx bármely más aminosav.)

olvasás számos formáját magában foglalja. Valószínűnek tűnik, hogy energiaváltó ellenőrző-olvasás is végbemegy [13], amelyik az aminoacil-AMP képződése előtt fellelhető. Ez azonban az enzimet egy nem-specifikus állapotba hozza vissza, melyből csak egy molekula ATP felhasználásával emelhető újra növelt specificitású állapotba.

### Összefoglalás

A tRNA aminoacilezése a fehérje bioszintézis kulcslépése. Az aminosavval történő aminoacilezés megbízhatósága részben meghatározza a fehérje bioszintézis általános megbízhatóságát. Egy egy lépéses folyamatban az aminosavak közötti különbségtétel nem lehet jobb, mint 1% vagy 0,1%. Ezért a természet korrekciós vagy szerkesztési eljárást fejlesztett ki. Ez egy hidrolitikus lépést jelent, amennyiben egy rossz aminosav túlhaladt az első ellenőrzésen. Erre a célra külön ATP szükséges. A szintetázról függően ennek következtében a hiba 1 a 200 000, illetve a 500 000-re csökken. Feltételezhetjük, hogy a fehérje bioszintézis többi lépése (hírvivő szintézis, kódon-antikódon kölcsönhatás a riboszómán, peptidilátmenet) megbízhatósága körülbelül azonos. A természet különben feleslegesen pazarolná az energiát a tRNA aminoacilezésénél, ha ennél a lépésnél nagyobb lenne a megbízhatóság, mint amit a fehérje bioszintézis többi lépése követni tud.

### Summary

The aminoacylation of tRNA is a key reaction in protein biosynthesis. The fidelity of the aminoacylation of the tRNA with amino acids determines in part the overall fidelity of the protein biosynthesis. Distinction between amino acids in a single step process cannot be much better than an error rate of percent or permille. Therefore nature has evolved a proofreading or editing process. This includes a hydrolytic step in case that the wrong amino acid has passed the first control. Additional ATP is used for this process. Thereby the error is reduced to 1 in 200 000 up to 1 in 500 000 depending on the synthetases. It is postulated that also the other steps of protein biosynthesis (messenger synthesis, codon-anticodon-interaction at the ribosome, peptidyltransfer) are of about the same fidelity. It would be useless for nature and a waste of energy if aminoacylation of tRNA would have been developed to a level of highest fidelity while the other steps of protein biosynthesis cannot cope with this fidelity.

The mechanisms of proofreading, conformational change of enzymes etc. are discussed in detail.

### IRODALOM

1. M. SPRINZL, H. STERNBACH, F. VON DER HAAR, F. CRAMER, *Eur. J. Biochem.*, **81**, 579 (1977).
2. M. SPRINZL, H. STERNBACH, *Methods Enzymol.*, **59**, 182 (1979).
3. M. SPRINZL, F. CRAMER, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3049 (1975).
4. F. VON DER HAAR, F. CRAMER, *FEBS Lett.*, **56**, 215 (1975).
5. F. VON DER HAAR, F. CRAMER, *Biochemistry*, **15**, 4131 (1976).
6. G. L. IGLOI, F. VON DER HAAR, F. CRAMER, *Biochemistry*, **16**, 1696 (1977).
7. G. L. IGLOI, F. VON DER HAAR, F. CRAMER, *Biochemistry*, **17**, 3459 (1978).
8. L. C. M. DE MAEYER, *Ber. Bunsen Ges.*, **80**, 1189 (1976).
9. F. CRAMER, F. VON DER HAAR, G. L. IGLOI, in *Transfer RNA: Structure, Properties and Recognition* (Schimmel/Söll/Abelson), CSH, USA, p. 267, 1979.
10. J. J. HOPFIELD, T. YAMANE, V. YUE, S. M. COUTTS, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1164 (1976).
11. F. VON DER HAAR, H.-J. GABIUS, F. CRAMER, *Angew. Chem.*, **93**, 250 (1981); *Angew. Chem. Internat., Edit. Engl.*, **20**, 217 (1981).
12. G. WEHMEYER, F. VON DER HAAR, F. CRAMER, *Biochemistry*, közlésre benyújtva (1981).
13. J. J. HOPFIELD, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5248.



## MEGKÖZELÍTHETŐSÉG ÉS A MOLEKULÁRIS ELEKTROSZTATIKUS POTENCIÁL ÖSSZEVETÉSE B- ÉS Z-DNS-BEN

BERNARD PULLMAN

(Institut de Biologie Physico Chimique, Laboratoire de Biochimie Théorique associé au C.N.R.S., 13,  
rue Pierre et Marie Curie — 75005 — Párizs, Franciaország)

### Bevezetés

Biomolekulákban a térbeli hatások legegyszerűbb megnyilvánulási formája véleményem szerint a reaktív helyek megközelíthetőségével kapcsolatos. Ez a fogalom különösen biopolimereknél fontos, mivel ezeknek gyakran bonyolult háromdimenziós szerkezetük van. Bár a hozzáférhetőség vagy gyakrabban inkább a hozzá nem férhetőség (térbeli akadály) fogalma kvalitatíve igen elterjedt a kémikusok és biokémikusok körében, a fogalom kvantitatív leírása sokkal kevésbé megoldott. A *hozzáférhető felület* kvantitatív meghatározását csak 1971-ben vezette be LEE és RICHARDS [1] abból a speciális célból, hogy oldószer (víz) fehérjékhez való hozzáférhetőségét tanulmányozza. Első pillanatra furcsának tűnik, hogy ennek használata erre a speciális területre korlátozódott [2—5]. Nukleinsavakra csak nemrég terjesztette ki a fogalmat Ponnuswamy és Thiyagarajan Indiában [6, 7], Alden és Kim az Egyesült Államokban, és általánosabb értelmezésben a mi laboratóriumunk [10, 11]. Lee és Richards eredeti elképzelését módosítottuk és kiterjesztettük oly módon, hogy a fogalom alkalmazási körét megnöveltük úgy, hogy közben remélhetőleg kikerültük más szerzők kezelésmódjában levő buktatókat.

Mielőtt a részletekbe belemennénk, szeretnénk a problémát kiterjeszteni. A reaktív helyhez való hozzáférhetőség fogalma természetesen szélesebb értelemben, így bármilyen támadó ágens esetében használható. Másrészt rendkívül félrevezető, ha egy támadás valószínűsége, illetve hatékonysága vizsgálatánál a megközelíthetőséget használjuk egyetlen feltételként. Valójában ha egy helyet a támadó ágens egyáltalán nem tud megközelíteni, semmi sem történik. Mi van akkor viszont, ha egy nukleinsavban számos pozíciót, különböző mértékben ugyan, de meg tud közelíteni a támadó fél? Nyilvánvaló, hogy a támadás nem okvetlenül a legjobban hozzáférhető ponton következik be, mivel más faktorok, így különösen a célpont elektronikus tulajdonságai is fontos szerepet játszanak.

Ezért, ha a reakció keresztülvihetőségéről megközelítőleg is megbízható képet akarunk kapni, a hozzáférhetőség fogalmat kezdettől fogva a reakcióban alapvetően szerepet játszó elektronikus faktorokkal együtt kell szemlélnünk. Valójában számos ilyen, részleteiben nehezen kifejezhető tényező van. Ilyen tényező a nukleinsavak



molekuláris elektrosztatikus potenciálja, mely vizsgálataink szerint alapvető szerepet játszik ezeknek az igen anionos karakterű biopolimerek (és alkotórészei) elektrofil ágensekkel való kölcsönhatásában. Ezek az ágensek a reagensok nagy csoportját foglalják magukban, többek között a karcinogén anyagok is ide tartoznak [17—19]. A fentiek tükrében a két fő tényezőt, a megközelíthetőséget és a molekuláris elektrosztatikus potenciált párhuzamosan vesszük figyelembe külső reagensekkel támadható nukleinsavak reaktív helyeinek közelítő meghatározásánál. Ebben az előadásban a klasszikus B-formájú és az újabb felfedezett Z-formájú DNS-sel kapcsolatos néhány érdekes kérdést tárgyaljuk, Madame Pullman hasonló kérdéseket a tRNS<sup>Phe</sup>-sel kapcsolatosan fog megvitatni az ezt követő előadásban.

### Módszer

Mivel ez a szimpóziium a térbeli jelenségekkel foglalkozik, röviden érintjük azt a módszert, mellyel a reaktív helyekhez való atomi hozzáférhetőséget kiszámítottuk. Az elektrosztatikus molekuláris potenciálok számítási részletei a [10—16] és [20] hivatkozásokban találhatók.

A hozzáférhetőség számítása [21] során a két kölcsönható molekula atomjait adott sugarú gömbbel ábrázoljuk. Az atomközéppontú gömbök metszik egymást és egy külső burkot hoznak létre a molekula körül. Tiltott térbeli kölcsönhatás akkor lép fel, ha a molekulák burkai átfedik egymást. Mivel a kölcsönható molekulák esetleges szerkezeti megváltozását nem vesszük figyelembe a számított hozzáférhetőségek sztatikus hozzáférhetőségek.

Mint ahogy fentebb említettük, az eljárást azzal kezdjük, hogy a makromolekula (mondjuk B-DNS) minden egyes atomja köré gömböt helyezünk el. A gömbök sugara az atomok Van der Waals rádiusza Pauling szerint [22], a szén esetében Webb szerint [23]. A sugarak számértékei: H : 120 pm, C : 160 pm, N : 150 pm, O : 140 pm, P : 190 pm. Mindegyik atomot, a hidrogéneket is beleértve külön ábrázoljuk.

Ha a támadó fél egyszerű gömbnek tekinthető (ez az eset fém kation, vagy egyszerűsített ábrázolásmódnál víz esetében) ezzel a reagenssel szemben a B-DNS adott atomjához a hozzáférhetőség számítása viszonylag egyszerű. Először a támadó gömböt kölcsönhatásba hozzuk a B-DNS receptor atomját körülvevő gömbbel. Meghatározott lépésközzel a receptor atom felületén mozgatjuk a támadó gömbfelületet és minden pontban megvizsgáljuk, hogy metszi-e a B-DNS valamelyik atomját körülvevő gömböt, azaz a merev gömb model szintjén megvalósítható-e az adott konfiguráció sztérikusan. A fogadó atom megközelíthető területe (accessible area, AA) a támadó gömbbel szemben úgy számítható ki, hogy a felosztás szerint nagyszámú (600) konfigurációt veszünk figyelembe, a megengedett konfigurációk számát elosztjuk az összes kipróbált konfigurációk számával, majd megszorozzuk a receptoratomot körülvevő gömb teljes felületével. A paraméter értéke a teljes hozzáférhetetlenségtől (0,0) a maximális hozzáférhetőségnek megfelelő  $A_n$ -ig (a receptoratom felülete)



változhat. Meg kell azonban jegyezni, hogy ha a B-DNS alkotóelemeit, a bázisokat, a cukor és a foszfát részt külön-külön vizsgáljuk, az atomok megközelíthetőségi faktora az alegység többi atomjának térbeli gátló hatása következtében a maximális értéknél kisebb lesz. Ezt a megközelíthetőséget belső hozzáférhetőségi területnek (intrinsic accessible areának, IAA) nevezzük ellentétben ugyanennek az atomnak az AA értékével, melynél a makromolekula hatását is figyelembe vesszük. Az AA érték ennek következtében megegyezik az IAA értékkel, ha a makromolekula többi építőeleme nem fejt ki zavaró hatást, kisebb, ha ilyen gátlás fellép. Így az IAA és az AA értékek összehasonlítása lehetőséget nyújt, hogy megállapítsuk mekkora hatást gyakorol a makromolekuláris környezet az adott alegység atomjának hozzáférhetőségére. Ha a támadó fél nem gömbszerű, hanem többatomos molekula, vagy ion a hozzáférhetőség kiszámítására külön eljárás szükséges. Ezt a víz példáján mutatjuk be. A támadó molekula egyik atomját a makromolekula receptoratomjával kölcsönhatásba hozzuk. Ez lehet a vízmolekula oxigénatomja, vagy az egyik hidrogénatom. A támadó molekulával szemben a receptoratom hozzáférhetőségének mérésére két paramétert veszünk figyelembe, ez a kettősség azzal van kapcsolatban, hogy a receptoratomon minden érintkezési ponthoz többféle vízmolekula konfiguráció tartozik. Az első paraméter nem veszi közvetlenül figyelembe a támadó molekula konfigurációját a receptoratom felületén, meghatározása hasonló az egyszerű gömmbel szembeni hozzáférhetőség definíciójához: ez a receptoratomon egy olyan terület, amelyen belül a támadó molekula úgy elhelyezhető, hogy érintkezik a választott atommal, és a támadó molekulának legalább *egy olyan lehetséges konfigurációja van*, melynél az alkotó atomi gömbök a makromolekula burkolófelületével nincsenek átfedésben. Jelölésként az egyszerű gömbnél alkalmazott AA rövidítést tartjuk meg, zárójelben tüntetjük föl a támadó molekulát, a makromolekulával érintkezésbe lépő atomot pedig aláhúzzuk.

A második paraméter a támadó molekula konfigurációs flexibilitását veszi figyelembe a receptoratom felületén. A támadó molekula lehetséges konfigurációjának az a része, mely (az első paraméter által meghatározott megközelíthető területen belül a kiválasztott atom érintkezve a receptorral) nem jár együtt a makromolekula burkolófelületének megsértésével. A támadó molekula érintkező felületén meghatározott lépésközzel mozgatva az összes lehetséges konfigurációt kipróbáljuk úgy, hogy a receptoratomon levő adott ponttal érintkezésbe hozzuk, és a támadó molekulát az érintkező atomok középpontja által meghatározott tengely körül elforgatjuk. Ezt a második paramétert „viszonylagos konfigurációs mozgékonyiságnak (angolul fractional configurational flexibility, FCF) nevezzük, és zárójelben adjuk meg a támadó atomot és az érintkező atomot, pl. FCF (HOH). A támadó molekula nagyszámú konfigurációja miatt, melyeket az AA és az FCF számításánál ki kell próbálni a receptor és a támadó atom felületén nem lehet olyan finom felosztást alkalmazni, mint az egyszerű gömbalakú támadó ágens esetében. A számítási idő elfogadható szinten való tartása céljából a pontok számát mintegy 300-ra csökkentettük. Megbizonyosodtunk róla, hogy a víz AA számításánál ez a számítások pontosságát csak kismértékben csökkenti, az értékek 1000 pm<sup>2</sup>-en belül pontosak.

Az eddigi alkalmazásokban gömbalakú reaktánszal számoltunk többnyire. Az itt következő eredményekben kis, 120 pm sugarú gömbbel számoltunk. Kimutattuk, hogy egy támadó vízmolekula egy hidrogénatommal helyettesíthető [21]. Általánosabb értelemben, mivel a gömb ilyen kicsi az eredmények a receptor helyén levő maximális hozzáférhetőséget adják meg.

### Eredmények és diszkusszió

#### B-DNS

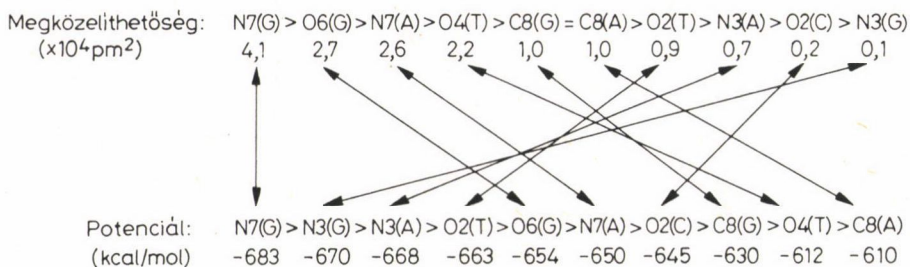
Az 1. táblázat purinok és pirimidinek reaktív helyeinek megközelíthetőségét mutatja (120 pm sugárral számolva) a szabad bázisokban (baloldalt) és a B-DNS-be beépített bázisokban (jobbaldalt), a koordinátákat a [24]-es hivatkozásból vettük. A táblázat legérdekesebb jellegzetessége az izolált- és a DNS-ben levő bázisok a megközelíthetőségek fordított rendje. Míg az izolált bázisokban a karbonil oxigénatomok jelentik a legjobban megközelíthető helyeket, a helyzet B-DNS esetében összetettebb, a legjobban megközelíthető atomok a guanin N7 és O6 atomjai, szokásos jelölés N7(G), O6(G). Az 1. ábrán összehasonlítottuk a B-DNS kettős spirálján belül az elektrofil támadás célpontjaiként szóbajöhető atomok hozzáférhetőségének rendjét ugyanezekhez az atomokhoz tartozó elektrosztatikus potenciál minimumokkal [25, 26]. Az ábrából nyilvánvaló, hogy míg a guanin N7 atomja egyaránt a legalacsonyabb potenciálú és a legnagyobb hozzáférhetőségű, sok eltérés van a többi atom potenciáljainak és hozzáférhetőségeinek relatív rendjében. Az egyik legszembetűnőbb különbség a guanin N3 atomjában van, melynek potenciálja a második legnagyobb és ugyanakkor csaknem elhanyagolható a megközelíthetősége. Ha csak az elektrosztatikus potenciált vesszük figyelembe az N3(G) atom egy elektrofil reakció valószínű célpontjának tűnik, sokkal kevésbé ez a helyzet ha a hozzáférhetőséget is figyelembe

1. táblázat

A bázisok megközelíthetőségi értékei  $\times 10^{-4}$  (pm<sup>2</sup>). Sugár: 120 pm

	Izolált	B-DNS-ben
G	O6 > N7 > N3 > C8 > N2 > N1 11,1 7,7 5,6 4,4 3,5 1,9	N7 > O6 > C8 > N3 4,1 2,7 1,0 0,05
A	N3 > N7 > N1 > C8 > N6 7,1 6,5 5,9 4,5 3,4	N7 > C8 > N3 2,6 1,0 0,7
C	O2 > N3 > C6 > C5 > N4 11,6 5,43,6 3,5 3,4	C5 > C6 $\approx$ N4 $\approx$ O2 0,3 0,2 0,2 0,2
T	O2 > O4 > C6 > N3 = C5 11,2 9,3 3,3 1,7 1,7	O4 > O2 2,2 0,9
	O2(C) > O2(T) > O6(G) > O4(T) > N7(G) > N3(A) > N7(A)	N7(G) > O6(G) > N7(A) > O4(T) > C8(G) = C8(A) > O2(T) > N3(A)





1. ábra. A B-DNS-ben a reaktív helyeken a megközelíthetőségek és a molekuláris elektrosztatikus potenciálok

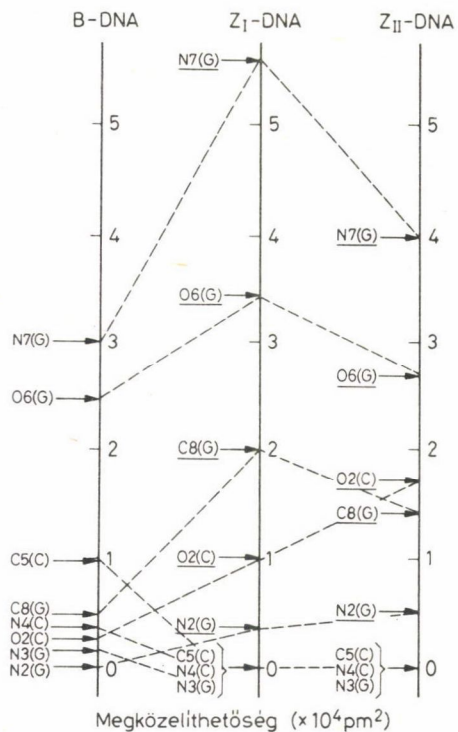
vesszük. Ezért rendkívül érdekes az a tény, mely SINGER összeállításában szerepel [27], mi szerint elektrofil alkilező ágensekkel végzett nagyszámú alkilező reakció esetében a nukleinsavak reakcióképes centrumainak a guanin N7 atomja adódott, ugyanakkor ennek a bázisnak N3 atomja a nagy elektrosztatikus potenciál ellenére kevésbé reakcióképes. Ez nyilván a hely kicsi megközelíthetőségével függ össze, és a példa egyben az itt bemutatott eredmények gyakorlati jelentőségét is jól mutatja.

### Z-DNS

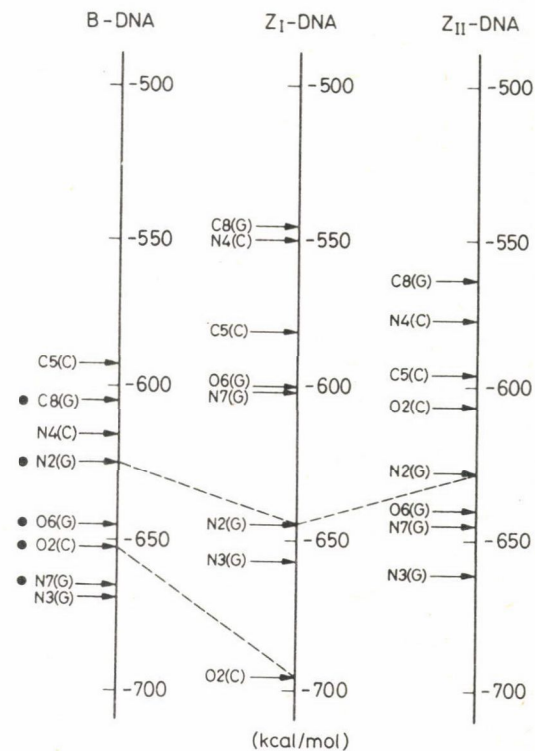
Egy ellentétes példa, mely azt illusztrálja, hogy a reaktivitás meghatározására nem alkalmas egyedül a hozzáférhetőség a nemrég felfedezett balsodrású DNS, ún. Z-DNS érdekes esete [28—31]. A krisztallográfiai adatok és a megfelelő modell alapján Rich és munkatársai [28] rámutattak arra, hogy a bázisokon belül számos reakciócentrum jobban hozzáférhető a Z-DNS-ben, mint a B-DNS-ben. Ez a megfigyelés különösen az N7(G), O6(G) és a C8(G) atomokra vonatkozik, melyek több karcinogén vegyület kovalens kötőhelyeként ismeretesek. Néhány szerző ezek alapján feltételezi, hogy a B-DNS-ben levő Z fragmensek ilyen karcinogének támadásával szemben különösen érzékeny célpontok.

Számításaink szerint a Z-DNS-ben számos fontos fogadó hely megközelíthetősége megnövekedett és [32, 33], különösen a fentebb említett három helyen a guanin molekulában, összehasonlítva a B-DNS ugyanazon helyeivel. Az eredményeket a 2. ábrán mutatjuk be a Z-DNS  $Z_I$  és  $Z_{II}$  változataira [29]. Ugyanezen helyek molekuláris elektrosztatikus potenciáljának összehasonlítása viszont azt mutatja, hogy a Z-DNS-ben a fenti receptor helyek potenciálja kisebb, mint a B-DNS-ben (3. ábra). Felmerül a kérdés a két faktor közül melyik a meghatározó a támadó elektrofil ágenssel szembeni viselkedésnél.

Az előbbiekhöz hozzá lehet tenni, hogy a Z-DNS tömény só oldatban stabilis, ezért a számításokat ilyen feltételeket szimuláló körülmények között megismételtük, úgy, hogy a foszfátokat fém kationnal árnyékoltuk le. Az eredmények a fenti probléma szempontjából változatlanok [33].



2. ábra. A B és Z-DNS-ben a reaktív helyek mekközelíthetőségeinek összehasonlítása



3. ábra. A B és Z-DNS-ben a reaktív helyek elektrosztatikus potenciáljainak összehasonlítása

Egy legutóbbi közlemény szerint [34] a poli (dG—dC) és poli (dG—dC) reaktivitása a karcinogén *N*-2-acetilaminofluorénnal szemben lényegesen kisebb olyan körülmények között, amikor a polimer Z-formában van (55% etanolban, vagy 1M  $\text{MgCl}_2$ -ben), mint amikor B-formában van jelen (25% etanol, vagy alacsony  $\text{Mg}^{2+}$  koncentráció). Ez az eredmény arra utal, hogy ebben az esetben a Z-DNS-ben levő guanin C8 elektrosztatikus potenciáljának csökkenése a B-DNS-sel szemben az uralkodó, és ez felülmúlja a Z-DNS-ben levő nagyobb megközelíthetőségtől származó hatást.

### Következtetések

Az előadás nyilvánvaló végkövetkeztetése az, hogy a térbeli és elektronikus hatások keverednek a biomolekulákban és megnehezítik ezen tulajdonságok meghatározását. Nyilvánvalóan jogos, és hasznos, hogy ezeket a tényezőket külön-külön tárjuk fel, ugyanakkor a reaktivitás gyakorlati problémáinak vizsgálatánál kölcsönös függőségüket figyelembe kell venni.

### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerző köszönetét fejezi ki a National Foundation for Cancer Research-nek (USA) a munka támogatásáért.

### Összefoglalás

A klasszikus B és az újonnan felfedezett Z-formájú DNS reaktív helyein kiszámítottuk a megközelíthetőséget és a molekuláris elektrosztatikus potenciált. Ezen polimerek biokémiai tulajdonságai meghatározására szolgáló két faktor erősen függ egymástól.

### Summary

Accessibilities and molecular electrostatic potentials are computed at the reactive sites of the classical B and recently discovered Z- form of DNA. It is shown that the two factors are strongly interdependent for the determination of the biochemical behaviour of these polymers.

### IRODALOM

1. B. K. LEE, F. M. RICHARDS, J. Mol. Biol., 55, 379 (1971).
2. F. M. RICHARDS, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 6, 151 (1977).
3. P. K. PONNUSWAMY, P. MANAVALAN, J. Theor. Biol., 60, 481 (1976).
4. P. MANAVALAN, P. K. PONNUSWAMY, A. R. SCRINIVASAN, Biochem. J., 167, 171 (1977).
5. S. J. WODAK, J. JANIN, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 77, 1736 (1980).
6. P. K. PONNUSWAMY, P. THIYAGARAJAN, Biopolymers, 17, 2503 (1978).
7. P. THIYAGARAJAN, P. K. PONNUSWAMY, Biopolymers, 18, 2333 (1979).
8. C. J. ALDEN, S. H. KIM, J. Mol. Biol., 132, 411 (1979).



9. C. J. ALDEN, S. H. KIM, *Stereodynamics of Molecular Systems*, R. H. Sarma ed., Pergamon Press, New York, p. 331 (1979).
10. R. LAVERY, A. PULLMAN, B. PULLMAN, *Theoret. Chim. Acta*, 57, 233 (1980).
11. K. ZAKRZEWSKA, R. LAVERY, A. PULLMAN, B. PULLMAN, *Nucleic Acid Research*, 8, 3917 (1980).
12. R. LAVERY, A. PULLMAN, B. PULLMAN, M. DE OLIVEIRA, *Nucleic Acid Research*, 8, 5095 (1980).
13. R. LAVERY, A. PULLMAN, B. PULLMAN, *Theoret. Chim. Acta*, 57, 233 (1980).
14. R. LAVERY, A. PULLMAN, B. PULLMAN, *Int. J. Quant. Chem.*, 20, 259 (1981).
15. K. ZAKRZEWSKA, R. LAVERY, B. PULLMAN, in *Biomolecular Stereodynamics*, R. H. Sarma ed., sajtó alatt.
16. A. PULLMAN, B. PULLMAN, *Quart. Rev. Biophys.*, sajtó alatt.
17. B. PULLMAN, A. PULLMAN, in *Carcinogenesis: Fundamental Mechanisms and Environmental Effects*, Proceeding of the 13th Jerusalem Symposium, B. PULLMAN, P. O. P. IS'O, H. GELBOIN eds. Reidel Publishing Co. Dordrecht, 1980, p. 55.
18. A. PULLMAN, B. PULLMAN, *Int. J. Quant. Chem. Quant. Biol. Symp.*, 7, 245 (1980).
19. B. PULLMAN in *New Horizons in Biological Chemistry*, M. KOIKE, T. NAGATSU, J. OKUDA, T. OZAWA Eds. Japan Scient. Soc. Press Tokyo 1980, p. 31.
20. A. PULLMAN in *New Horizons in Biological Chemistry*, M. Koike, T. Nagatsu, J. Okuda and T. Ozawa Eds. Japan Scient. Soc. Press Tokyo 1980, p. 19.
21. R. LAVERY, A. PULLMAN, B. PULLMAN, *Int. J. Quant. Chem.*, 20, 49 (1981).
22. L. PAULING, in *The Nature of the Chemical Bond*, 3rd Ed. p. 260, Cornell Press (1960).
23. J. L. WEBB, in *Enzymes and Metabolic Inhibitors*, New York, Academic Press (1960).
24. S. ARNOTT, D. W. L. HUKINS, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 47, 1504 (1972).
25. B. PULLMAN, D. PERAHIA, D. CAUCHY, *Nucl. Acids. Res.*, 6, 3821 (1979).
26. A. PULLMAN, B. PULLMAN, *Int. J. Quant. Chem. Quant. Biol. Symp.*, 7, 245 (1980).
27. B. SINGER, *Prog. Nucl. Acid. Res.*, 15, 219 (1975).
28. A. H.-J. WANG, G. J. QUIGLEY, F. J. KOLPAK, J. L. CRAWFORD, J. H. VAN BOOM, G. VAN DER MAREL, A. RICH, *Nature*, 282, 680 (1979).
29. A. H.-J. WANG, G. J. QUIGLEY, F. J. KOLPAK, G. VAN DER MAREL, J. H. VAN BOOM, A. RICH, *Science*, 211, 171 (1980).
30. J. L. CRAWFORD, F. J. KOLPAK, A. H. J.-WANG, G. J. QUIGLEY, J. H. VAN BOOM, G. VAN DER MAREL, A. RICH, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4016 (1980).
31. H. R. DREW, T. TAKANO, S. TANAKA, K. ITAKURA, R. E. DICKERSON, *Nature*, 286, 567 (1980).
32. K. ZAKRZEWSKA, R. LAVERY, A. PULLMAN, B. PULLMAN, *Nucl. Acids Res.*, 8, 3917 (1980).
33. K. ZAKRZEWSKA, R. LAVERY, B. PULLMAN, in *Biomolecular Stereodynamics* R. H. SARMA ed., Pergamon Press, New York, sajtó alatt.
34. R. M. SANTELLA, D. GRUNBERGER, I. B. WEINSTEIN, A. RICH, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 78, 1451 (1981).

## MEGKÖZELÍTHETŐSÉG ÉS A MOLEKULÁRIS ELEKTROSZTATIKUS POTENCIÁL ÖSSZEVETÉSE tRNS<sup>Phe</sup> MOLEKULÁBAN

ALBERTE PULLMAN

(Institut de Biologie Physico-Chimique, Laboratoire de Biochimie Theorique associé au C.N.R.S.,  
13 rue Pierre et Marie Curie — 75005 — Párizs, Franciaország)

### Bevezetés

B. PULLMAN előadásában [1] térbeli és elektronikus hatások közötti kapcsolat általános problémáját írta le a nukleinsavak területén, és ezt a B- és Z-DNS-ben reaktív helyek megközelíthetősége és molekuláris elektrosztatikus potenciálja közötti kölcsönhatás példáján mutatta be.

Előadásom célja ezen kölcsönhatás néhány szempontjának bemutatása a tRNS<sup>Phe</sup> területén. A tRNS-ek rendkívül összetett térbeli szerkezetük miatt ebből a szempontból különösen érdekesek. Mindenféle szimmetria hiánya, a háromdimenziós szerkezet teljes szabálytalansága és viszonylagos tömörségük a megközelíthetőségben helyi nehézséget, a molekuláris elektrosztatikus potenciálban nagy változatosságot okozhat. Ezeknek a tulajdonságoknak a kölcsönös függése és ennek ezen savak kémiai és biokémiai reaktivitásukra gyakorolt hatása izgalmas kihívás az elméleti analízis számára. A módszer részleteire történő hivatkozások az előző előadás irodalmi részében találhatók, ebben az előadásban ezen a területen végzett kiterjedt vizsgálatainkról adunk számot [2—8]. Számításaink Sussman és munkatársai által meghatározott ortorombos kristályszerkezetű élesztő-tRNS<sup>Phe</sup> geometriai adatain alapulnak [9]. Először a foszfát csoportokkal kapcsolatos, majd a purin és pirimidin bázisokat érintő problémákat tárgyaljuk.

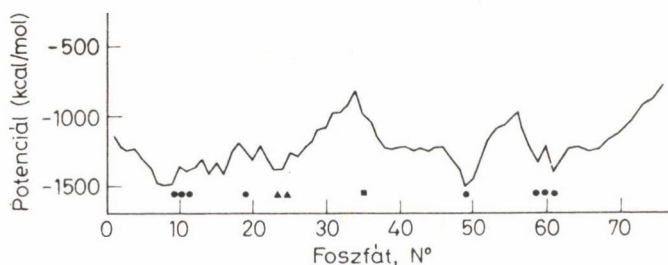
### Eredmények és diszkusszió

#### A foszfátok

A tRNS<sup>Phe</sup> molekulában 76 foszfát van, mindegyiknek más a potenciálja és a megközelíthetősége. Az itt megadott potenciál adatok az ún. híd pozícióra vonatkoznak, ez a pont a foszfor atom és a két anionos oxigénatom által meghatározott síkban a két oxigénatomtól egyformán 215 pm-re van. Egy izolált foszfát csoportban ez a nátriumion ideális helye. Az adatok a tRNS-ben levő cukorfoszfát gerinc mentén a foszfátcsoport potenciáljának változásáról adnak felvilágosítást. A megközelíthetőségi értékek a két anionos oxigénatom megközelíthetőségeinek átlagai. Támadó gömbként



95, 160 és 220 pm-es sugarú gömböket vizsgáltunk. Nyilvánvaló, hogy szigorúan véve a potenciálok és megközelíthetőségek nem ugyanolyan térfogatú elemre vonatkoznak. Nem kétséges azonban, hogy bizonyos fokig a foszfátcsoport két tanulmányozott jellemzőjének felelnek meg, egymással szembeni vizsgálatuk kölcsönhatásukról ad értékes információkat. A két tulajdonság az 1. és a 2. ábrán látható, melyek a két jellemző érték változását illusztrálják a lánc mentén, és lehetővé teszik, hogy kölcsönös függőségüket, illetve függetlenségüket értékeljük. Ez a változékonyság a tRNS<sup>Phe</sup> szerkezetének ismeretében értelmezhető [3].



1. ábra. A tRNS<sup>Phe</sup> foszfát csoportjain levő elektrosztatikus potenciál és a foszfátok nitrozókarbamiddal szembeni reaktivitása [10]: ● a legkevésbé reakcióképes foszfátok; ▲ alacsony aktivitású foszfátok; ■ meghatározatlan

Rendkívül érdekes új kísérleti eredmények lehetővé teszik, hogy a két tényező egymáshoz viszonyított szerepéről a foszfátok kémiai reaktivitását illetően felvilágosítást kapjunk. Itt Ebel és munkatársai [10] etilnitrozókarbamid tRNS-sel való reakciójának kvantitatív vizsgálatára gondolunk. Ez a reagens a foszfodiészter kötés anionos oxigénjét alkilezi. A kinyújtott makromolekulában mindegyik foszfát reakcióképes. Ezzel szemben a hajtogatott formájú vegyületben különböző helyen levő foszfátok különbözőképpen reagálnak. Különösen a 9, 10, 11, 19, 49, 58 és 60-as foszfátok reaktivitása erősen lecsökkent, a 23 és 24-es pedig részlegesen. Ebben a tanulmányban alkalmazott módszer nem teszi lehetővé terminális foszfátok reaktivitásának meghatározását mindkét végétől számítva 7—10 foszfát egységig. Hasonlóképpen a 33 és 35-ös foszfát reaktivitását sem lehetett meghatározni, a 32-es 34-es ribózok 2'-OH csoportjainak természetes metileződése következtében.

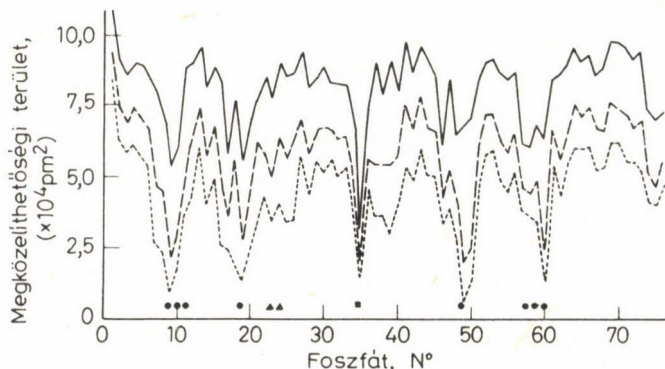
A 2. ábrán ezeket a kísérleti eredményeket a különböző foszfátok anionos oxigénjeinek megközelíthetőségével hozzuk kapcsolatba. A kapcsolat rendkívül szembeötlő, ugyanis a csökkent reaktivitáshoz erősen lecsökkent megközelíthetőség tartozik.

Az 1. ábrán a tRNS<sup>Phe</sup> foszfátjainak etilnitrozókarbamiddal szembeni lecsökkent reaktivitását vetettük össze. Meglepő módon a csökkent reaktivitású foszfátok legtöbbje éppen a legalacsonyabb potenciálú. Ez az első pillanatban meglepő



eredmény érthetővé válik, ha meggondoljuk, hogy ebben az igen bonyolult makromolekulában a legalacsonyabb foszfát potenciálok egyben a legkevésbé hozzáférhetőek. Ezért, míg a nyújtott savban mindegyik foszfát reagál az etil-nitrozokarbamiddal, jelezvén a reagens nagy belső affinitását, a hajtogatott szerkezetben ezen helyek közül számos hozzáférhetetlenné válik és ez akadályozza meg a reakciót, annak ellenére, hogy a hozzá tartozó potenciál alacsony.

Ez a példa ezért azt az esetet illusztrálja, amikor a reaktív hely megközelíthetősége dönti el a reakció végbemenetelét.



2. ábra. A tRNA<sup>Phe</sup> foszfát csoportjainak megközelíthetőségei 95 pm (—), 160 pm (---), 220 pm (...) sugárral. A foszfátok etilnitrozokarbamiddal szembeni reaktivitása (a magyarázatot l. az 1. ábrán).

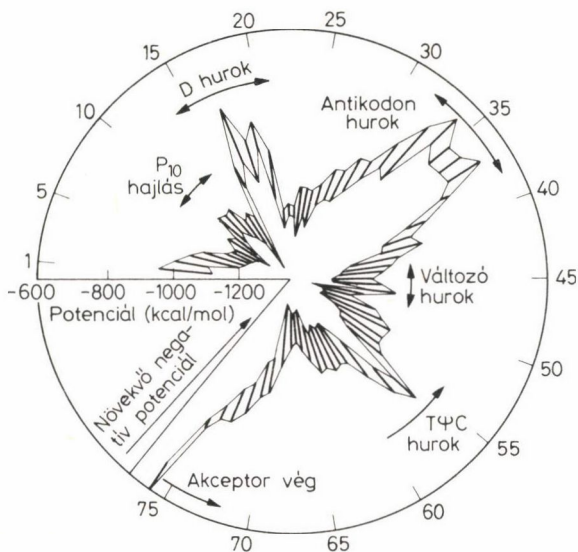
### Purin és pirimidin bázisok

A 3. és 4. ábrán a tRNA<sup>Phe</sup> különböző bázisainak teljes potenciálját és a megközelíthetőségét tüntettük fel az ún. kerék-diagram formájában (részletes számszerű értékek az [5]-ös hivatkozásban találhatók). A 3. ábrán a rádiusz mentén egy potenciál skála van –600-tól –1350 kcal/mól (–2460-tól –5535 kJ/mól), a negatívabb potenciálok a kör közepe felé helyezkednek el. Ezen az ábrán minden bázist egy sugárirányú vonal szemléltet, melynek végei a bázison levő legnegatívabb és legkevésbé negatívabb potenciálnak felelnek meg. A radiális vonalak végét a potenciáeloszlás világosabb szemléltetése céljából összekötöttük.

A grafikonokból nyilvánvaló, hogy a bázisokra nézve igen erős szerkezet-potenciál összefüggés érvényes. Az ábrán nyilakkal jelöltük a különböző hurokrészeket és az akceptorvéget, látható, hogy az ezekben a régiókban levő bázisok kisebb potenciálúak, mint makromolekula magjához közel levő közbülső helikális szegmensek. A P10 hajlatban levő 10-es, 11-es, 12-es bázisok is alacsony potenciálúak. Ezzel szemben a bázis sorrend nem ugrik ki ebből a diagramból, mivel a bázisok egyéni természetét az anionos foszfát potenciáljainak eredője elnyomja. Ez a potenciálkerék a tRNA<sup>Phe</sup> lóherelelészerű ábrázolására emlékeztet és ennek segítségével az alacsony

potenciálú helyek (a periferális hurkok és az akceptorvég) valamint a magas potenciálú (központi helikális részek) könnyen lokalizálhatók.

A 4. ábrán hasonló elv alapján ábrázoltuk a „megközelíthetőségi kereket”. Itt a 0-tól 150 000 pm<sup>2</sup>-ig terjedő sugárirányú tengely a megközelíthetőségi területet jelöli, úgy, hogy a középpontban van a legnagyobb megközelíthetőség. Ismét minden bázist egy olyan vonallal jelölünk, melyeknek végei a legkisebb és a legnagyobb megközelíthetőségi helyet adják meg a tanulmányozott helyen. Hasonlóan a 3. ábrához, a tRNS



3. ábra. Elektrosztatikus potenciál kerék a tRNS<sup>Phe</sup>-ben levő bázis helyekre

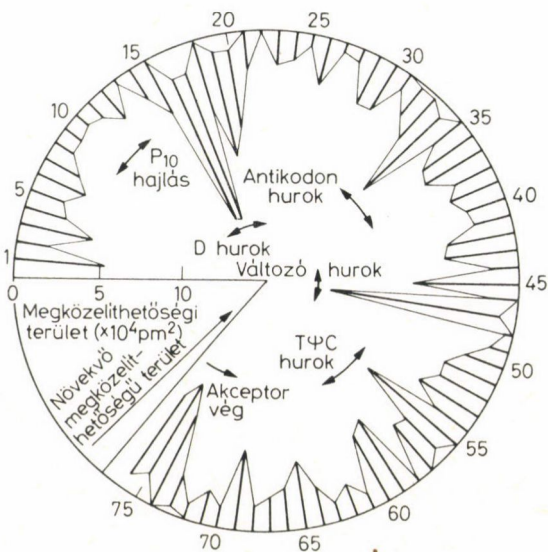
hurkokat külön jelöljük a „megközelíthetőségi keréken”, megállapítható, hogy minden hurokban két, vagy három különösen nagy megközelíthetőségi értékű bázis van, ez különösen igaz az akceptor végen levő terminális bázisokra. A megközelíthetőség-szerkezet összefüggések kevésbé jellegzetesek azonban, mint a potenciálok. Ez érthető, ha figyelembe vesszük, hogy a potenciált a távolható, az egész tRNS<sup>Phe</sup>-en keresztülhatoló foszfát-effektus határozza meg, a megközelíthetőségek a rövid távon ható térbeli gátlásoktól függenek, és sokkal érzékenyebbek helyi szerkezeti tulajdonságokra.

A 3. és 4. ábrán látottakból az a következtetés vonható le, hogy a hurok-részekben és az akceptorvégen levő bázisokhoz alacsony potenciál és magas megközelíthetőség tartozik, ugyanakkor a helikális magban levő bázisok magas potenciálúak és általában alacsony megközelíthetőségűek.

A tRNS<sup>Phe</sup> kémiai és biokémiai reaktivitásával kapcsolatos adatok jelentőségét megvizsgáltuk ezzel a biopolimerrel kapcsolatos néhány reakcióban. Sajnos csak kevés



és gyakran nem teljes adatkészlet áll rendelkezésre. Egy tanulmányt idézünk ezek közül, a részletek és más reakciók eredménye az [5, 8]-as hivatkozásokban található. Az előadásban a  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  és a ketoxal (metilglioxál) kölcsönhatásáról lesz szó a továbbiakban [11, 12]. Ez a reagens specifikusan a guanin bázissal reagál. A  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$ -ben csak 20-as és 34-es számú guanin bázisok kötik meg ezt a reagenst. A reakciótermék az N1 és N2 guanin atomokon szubsztitúcióval kialakuló hídős addukt, mint ahogy ez a glioxál példáján az 5. ábrán látható (részleteket illetően [13 és 14]).

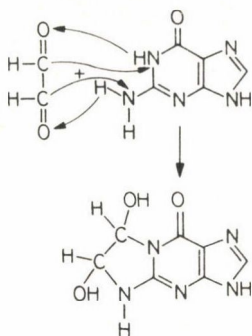


4. ábra. Megközelíthetőségi kerék a  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$ -ben levő bázisokra

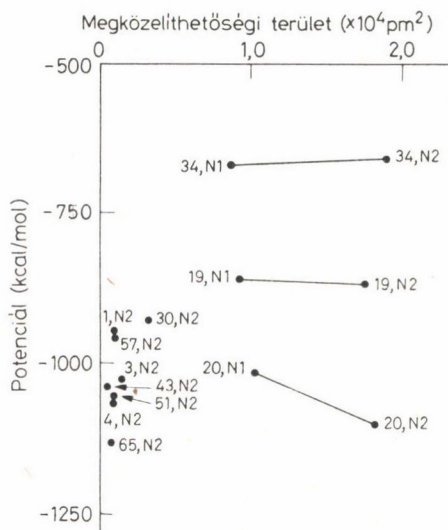
A 6. ábrán a számított megközelíthetőségeket (vízszintes tengely) és potenciálokat (függőleges tengely) vetjük össze. A diagramon minden egyes pont, tehát egy adott bázishoz tartozó potenciált és atomi megközelíthetőséget jelent. Ennek megfelelően a  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  minden guanin N1 és N2 atomjához tartozó értékpárt elhelyeztük az ábrán. A nulla megközelíthetőségű helyeket, mivel ezeken a helyeken nem várható reakció, nem tüntettük fel az ábrán.

Ha úgy az N1, mind az N2 atomok a fenti feltételek szerint megjelennek az ábrán a két atomot egy vonallal kötjük össze. Figyelemre méltó, hogy ez a feltétel éppen csak a 19, 20 és 34-es guaninokra érvényesül. A három bázis megközelíthetősége mindkét ponton nagy, N2 minden esetben jobban megközelíthető, mint N1 atom. A 20-as guanin N1 és N2 atomjai nagy negatív potenciálúak, a 34-es guaniné lényegesen kisebb, a 19-es pedig ezek között helyezkedik el. A 20-as és 34-es guanin reakciókészsége következőképpen érthető. A 19-es guanin inaktivitásának az lehet az oka, hogy míg a 20-as és 34-es guaninok pár nélküliek a 19-es guanin hidrogénhidakkal





5. ábra. Glioxál guaninnal való reakciója

6. ábra. Megközelíthetőség és elektrosztatikus potenciál a ketoxál tRNS<sup>Phe</sup> guanin bázisaival való kölcsönhatásaira. (A 20, N1 jelölés a 20-as guanin N1 atomját jelenti)

az 56-os citozinhoz kapcsolódik, a hidrogénhid képzésben, mind az N1 mind az N2 atom részt vesz és ezeket a kötések szét kell szakítani, mielőtt a ketoxállal való reakció végbemenne. Meg kívánjuk jegyezni, hogy a harmadik párnélküli guanin, az 57-es valószínűleg azért nem reagál, mert N1 és N2 atomjai nem hozzáférhetőek.

Ez a példa ismét a megközelíthetőség jelentőségét illusztrálja, ebben az összetett rendszerben.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerző köszönettel tartozik a National Foundation for Cancer Research-nak (Nemzeti Rákkutatási Alapítványnak), USA a munka támogatásáért.

## Összefoglalás

Néhány jellemző példán mutatjuk be, milyen szerepet tölt be a megközelíthetőség és az elektrosztatikus potenciál a tRNS<sup>Phe</sup> purin és pirimidin bázisainak és foszfátjainak biokémiai reaktivitásában. Ebben a rendkívül tömör és komplikált szerkezetben a megközelíthetőség igen fontos tényező.

## Summary

The role of the accessibility and of the molecular electrostatic potential for the biochemical reactivity of the phosphates and the purine and pyrimidine bases of tRNA<sup>Phe</sup> is illustrated on typical examples. In this highly compact and convoluted structure the role of accessibility seems to be of great importance.

## IRODALOM

1. B. PULLMAN, előző cikk.
2. R. LAVERY, A. PULLMAN, B. PULLMAN, Nucl. Acids Res., 8, 1061 (1980).
3. R. LAVERY, M. DE OLIVEIRA, B. PULLMAN, J. Computational Chem., 1, 301 (1980).
4. R. LAVERY, A. PULLMAN, B. PULLMAN, Theoret. Chim. Acta, 57, 233 (1980).
5. R. LAVERY, A. PULLMAN, B. PULLMAN, M. DE OLIVEIRA, Nucl. Acid Res., 8, 5095 (1980).
6. R. LAVERY, S. CORBIN, A. PULLMAN, Int. J. Quant. Chem., sajtó alatt.
7. R. LAVERY, A. PULLMAN, S. CORBIN, Biomolecular Stereodynamics könyvben, R. H. Sarma Kiadó: Pergamon Press, New York, sajtó alatt.
8. A. PULLMAN, B. PULLMAN, Quart. Rev. Biophys., sajtó alatt.
9. J. L. SUSSMAN, J. B. HOLBROOK, R. W. WARRANT, G. M. CHURCH, S.-H. KIM, J. Mol. Biol., 123 (1978).  
(Ebben a munkában Dr. S.-H. Kimtől személyes közlés alapján kapott, tovább finomított koordinátákat használtunk fel.)

## AZ ENZIMKATALÍZIS SZTEREOKÉMIÁJA

POLGÁR LÁSZLÓ

(Enzimológiai Intézet, Biológiai Kutatóközpont, Magyar Tudományos Akadémia, Pf 7 H—1052 Budapest, Magyarország).

### Bevezetés

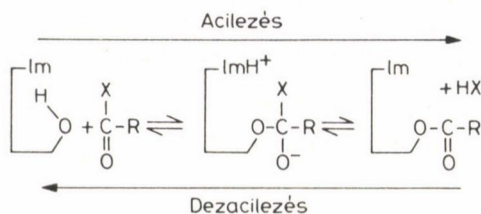
Nagy áttörést jelentett az enzimológiában, amikor a hatvanas években az első enzimnek, a lizozimnek, röntgendiffrakciós méréssel meghatározták a térszerkezetét. A széles körű vizsgálatok segítségével fényt derítettek a szubsztrát kötőmódjára, azonosították az aktív hely funkció csoportjait és felderítették a katalízis mechanizmusát [1]. Így tehát lehetővé vált az enzimkatalízis sztereokémiai vizsgálata. Ma már számos enzim háromdimenziós szerkezete ismeretes, köztük a szerin és a tiol proteinázoké, amelyeket a következőkben fogunk tárgyalni.

### Szerin proteinázok

*Alapmechanizmus.* A lizozimmal ellentétben a szerin proteinázok hatásmechanizmusa meglehetősen ismert volt, mielőtt háromdimenziós szerkezetüket meghatározták volna. A katalitikus folyamat [2] fő vonásait az 1. ábrán mutatjuk be. Látható, hogy a szubsztrát karbonil szénatomján a „reaktív” szerin hidroxil-csoportjának nukleofil támadását a hisztidin általános bázis katalízissel elősegíti. Ez tetraédres átmeneti termék és imidazolium ion képződéséhez vezet. Az intermedier általános savkatalízis következtében acilenzimet, imidazol bázist és alkoholt vagy aminot szolgáltat. Az acilenzim az acilezés fordított mechanizmusa szerint hidrolizál. Természetesen a hidrolízisben a vízmolekula hidroxil-csoportja a nukleofil a szerin hidroxil-csoportja helyett.

*Térszerkezet.* A szerin proteinázok katalitikus reakcióinak sztereokémiáját csak háromdimenziós szerkezetük meghatározása után tehetjük szemléletessé. Ezek a vizsgálatok megmutatták, hogy a különböző szerin proteinázok, mint a kimotripszin, a szubtilizin, az elasztáz és a tripszin (összefoglalót l. [3]) katalitikus helyeinek konformációja nagyon hasonló. A kötőhelyek azonban, melyek az egyes enzimek specificitását határozzák meg, némi különbséget mutatnak. Így a kimotripszin molekulának van egy zsebe, mely a szubsztrát aromás csoportját képes befogadni. A tripszinben, a zseb alján egy aszpartát csoport van, amely a pozitív töltésű arginin és lizin oldalláncokat köti meg. Az elasztáz esetében a valin oldallánca gátolja a zseb hozzáférhetőségét és így a szekunder kötőhelyeket helyezi előtérbe a szubsztrát számára.





1. ábra. Szerin proteinázok reakciómechanizmus sémája. X OR' vagy NHR' csoportot jelent acilezésben és OH csoportot dezacilezésben

**Modellépítés.** Egy katalitikus folyamat sztereokémiájának meghatározása nehéz probléma. Mivel egy jó szubsztrátot azonnal átalakít az enzim, valóságos enzim-szubsztrát komplexeknek a geometriáját még nem vizsgálták röntgendiffrakcióval. Viszont, enzimek és a természetes szubsztráttal rokon szerkezetű molekulák komplexeinek vizsgálata mint inhibitorok, termékek vagy rossz szubsztrátok, kiindulásként szolgálhatnak katalitikus intermedierek térbeli modelljeinek kiépítéséhez, mint a Michaelis-komplex, a tetraédes átmeneti termék és az acilenzim.

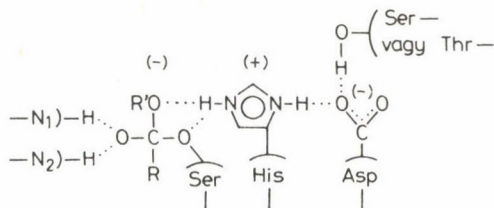
E célból a kristályban talált atomi koordinátákat, más vizsgálatokkal ellentétben, úgy módosítottuk, hogy bizonyos kémiai megfontolásokat kielégítsenek [4]. (Pl. azok az atomok, melyek között proton átvitel történik, egy hidrogén-kötésnyi távolságon belül kell legyenek.) Ez a modellépítési koncepció ésszerű, mert a kristályos enzim aktív helye nem szükségszerűen reprezentálja az aktív konformációt és mert a funkció csoportoknak némi mozgékonytságot meg kell engedni a katalízis folyamán. Mind a kimotripszinben, mind a szubtilizinben lehetséges volt a tetraédes intermediert úgy lokalizálni, amint azt különböző kémiai megfontolások megkívánták [4].

A szerin proteinázokkal képződött tetraédes átmeneti termékek sémáját mutatjuk be a 2. ábrán [5]. Látható, hogy a katalitikus intermediert egy kiterjedt hidrogénkötés-rendszer stabilizálja, mely két lényeges sztereokémiai elemet foglal magába: 1. a szerin, hisztidin és aszpartát tagokból álló katalitikus triádot és 2. az oxianion lyukat, ahol a tetraédes átmeneti termék negatív oxigén atomja két peptid NH-val képez hidrogénkötést. Ez a két elem további tárgyalást érdemel.

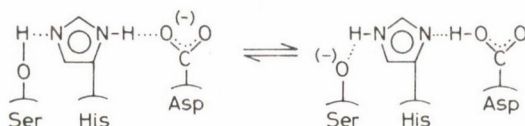
**A katalitikus triád.** Blow és munkatársai [6] figyelték meg először, hogy a szerin proteinázokban (kimotripszin) egy aszpartát karboxil csoport kölcsönhatásba lép a katalitikus hisztidin imidazoljával. Azt javasolták, hogy a karboxilátion negatív töltését az imidazol gyűrű közvetíti a szerin oxigén atomjához, amint az a 3. ábrán látható. A szerin-hisztidin-aszpartát triádot „charge relay” (töltésközvetítő) rendszernek nevezték el, mely a szerin oxigént erős nukleofillé teszi.

Hangsúlyoztuk [5, 7], hogy kémiailag valószínűtlen, hogy a szerin oxigén, mely erős bázis, protonja a sokkal kevésbé bázikus karboxiláthoz menne át, és azt javasoltuk, hogy a proton az imidazolon marad, amint az a 2. ábrán látható.

A katalitikus triádot minden szerin proteinázban kimutatták röntgendiffrakciós módszerrel [3] és mind kísérleti, mind elméleti módszerekkel megkísérelték tisztázni az aszpartát szerepét a katalízisben. NMR spektroszkópiai mérések először ellentmondásos eredményekre vezettek, majd az újabb eredmények a „charge relay” rendszer ellen szóltak. A probléma másik megközelítési módja a kvantumkémiai számítások, melyek során különböző modellekből kiindulva CNDO/2 és *ab initio* módszereket alkalmaztak. A triádot leggyakrabban metanollal, imidazollal és hangyasavval modellezték és a triád környezetét elhanyagolták. Ezek az *in vacuo* számítások a „charge relay” rendszert támasztották alá [8, 9].



2. ábra. A szerin proteinázok aktív helyénél a kiterjedt hidrogénkötés hálózat



3. ábra. A „charge relay” rendszer működése BLOW és mtsai szerint [6]

Annak érdekében, hogy különbséget tehessünk a hisztidin és aszpartát, mint proton akceptor között, megvizsgáltuk az imidazol-hangyasav diád proton egyensúlyát figyelembevéve 1. a fehérje környezet, 2. a tetraédes intermedier negatív töltését reprezentáló ellenion és 3. három vízmolekula hatását. Mindezek a hatások eltolták a semleges diád *in vacuo* kapott egyensúlyát az imidazolium-aszpartát ion-pár forma felé [10]. Egyéb, újabb számítások, némileg más megközelítést alkalmazva ugyanerre a következtetésre vezettek [11, 12].

Meg kell említeni, hogy újabban neutroindiffrakciós vizsgálattal egyértelműen igazolták, hogy a proton az imidazol csoporthoz kötődik [13]. Ennek megfelelően, korábbi véleményünkkel összhangban [5], arra a következtetésre jutottunk, hogy az aszpartát csoport fő katalitikus szerepe az, hogy stabilizálja a tetraédes intermedier és az imidazolium csoport közt kialakuló ion-párt.

**Oxianion lyuk.** Két peptid NH csoport is részt vállalhat a tetraédes átmeneti termék stabilizálásában, amint azt a 2. ábra mutatja. Ezt a sztereokémiai vizsgálatokból eredő [14, 15] lehetőséget viszont, kísérletileg még nem vizsgálták. Ezért tiono



szubsztrátokat szintetizáltunk, amelyben a karbonil oxigént ként helyettesíti és mértük hidrolízisüket kimotripszinnel és szubtilizinnel [16]. Azt vártuk, hogy ha az oxianion lyuk lényeges a katalízisben, akkor a tiono analógok sokkal lassabban hidrolizálnak, mint a megfelelő oxigén szubsztrátok, mivel az oxigén- és kénatomok mérete és hidrogén-kötés képző hajlama különböző.

Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

Proteinázok acilezésének sebességi állandói ( $M^{-1} s^{-1}$ ) tiono szubsztrátokkal 25 °C-on

	Metil hippurát		Etil acetil-fenilalaninát	
	„O”	„S”	„O”	„S”
Kimotripszin	31	< 1	15 000	< 1
Szubtilizin	18	< 0,6	45 000	< 2
Papain	240	540		
Kimopapain	13	31		

Az 1. táblázatból kitűnik, hogy a szerin proteinázok a tiono észtereket gyakorlatilag nem hidrolizálják és ez az első kísérleti bizonyíték az oxianion lyuk lényeges szerepére a tetraéderes átmeneti termék stabilizálásában. A tiono észterek eltérő viselkedését tiol proteinázokkal szemben, mint a papain és a kimopapain, szintén az 1. táblázatban mutattuk be és a következőkben tárgyaljuk.

### Tiol proteinázok

*Mechanisztikus különbségek a szerin és tiol proteinázok között.* A papain a legtöbbet tanulmányozott tiol proteináz. Az aktív helynél cisztein-hisztidin kettős foglal helyet és a cisztein reagál a szubsztráttal átmeneti acil-enzimet eredményezve [17]. Emiatt azt tételezték fel, hogy a szerin és tiol proteinázok azonos kémiai mechanizmus szerint működnek, mert egy hasonló oxianion lyuk léte konzisztens volt a papain háromdimenziós szerkezetével [18]. Viszont a következő különbségeket figyelembe kell venni a két mechanizmus között: 1. Az oxianion lyuk lehet, hogy nem lényeges az acilezési lépésben, mivel a tiono észtereket a tiol enzimek hidrolizálják (1. táblázat). 2. A katalitikus triád aszpartát oldalláncát aszparagin helyettesíti [19] ezért a negatív oxigén stabilizációja nem járulhat hozzá a katalízishez. 3. Az imidazol csoport általános bázis katalízise nem működik az acilezési lépésben. Ez abból következik, hogy több bizonyíték létezik arra, hogy egy merkaptid-imidazolium ion-párral [17] állunk szemben, mely egyben azt is jelenti, hogy a proton nem megy át egyidejűleg a kénatomnak a szubsztráton történő nukleofil támadásával, hanem az imidazol csoporton van még a szabad enzimben is. Az ion-pár létezésére két független



bizonyítékot említhetünk itt. 1. Az aktív papain SH csoportjának disszociált formáját spektrofotometriás úton figyelték meg, mérve a jellegzetes merkaptid abszorpciós sáv eltűnését az alkilezés folyamán [20]. 2. Az ion-pár másik tagját tekintve, újabb NMR vizsgálatok [21] megmutatták, hogy az imidazol csoport abban a pH tartományban protonált, amelyben a papain aktív.

*Az ion-pár geometriája a papainban és tiolszubtilizinben.* A tiolszubtilizin mesterséges enzim, melyet szubtilizinből állítanak elő az aktív hely szerínjének ciszteinre való cseréjével [22]. Hasonlóan a papainhoz, a tiolszubtilizin SH csoportját egy merkaptid-imidazolium ion-pár képződése aktiválja. Viszont, eltérően a papaintól, ez az enzim csak aktív észtereket képes hidrolizálni, mint pl. *p*-nitrofenil acetátot, de nem alkil észtereket és amid szubsztrátokat [22]. Ez a komoly differencia a két enzim katalitikus képességében hívta fel figyelmünket az ion-párok reakcióiban a sztereokémia jelentőségére [23]. Azt vártuk, hogy az ion-párok geometriájában a különbség már a merkaptid-ion alkilezési sebességében megmutatkozik negatív töltésű reagensekkel szemben, mint pl. jóddacetát, mivel a karboxilát anion és az imidazolium kation kölcsönhatása a reagáló kén- és szénatomok különböző elrendeződéséhez vezethet a két enzimben. Ez látható a 2. táblázatban [23], amely azt mutatja, hogy a papain több mint 1000-szer gyorsabban reagál a jóddacetáttal, mint a tiolszubtilizin. Másrészt a *semleges* jóddacetamid a két enzimet nagyjából ugyanolyan sebességgel alkilezi. Az is szintén jelentős, hogy a 3-jódpropionát nem mutat nagy reaktivitást papainnal szemben. Ebben a vegyületben a karboxil csoport messzebb van a reagáló szénatomtól, mint a jóddacetátban, és ennél fogva a reakcióhoz kedvező elrendeződés létrejötte lehetetlennek tűnik.

2. táblázat

Tiolenzimek alkilezési sebességi állandói ( $M^{-1} s^{-1}$ ) 25 °C-on

	Jóddacetát	Jóddacetamid	3-Jódpropionát
Papain	1100	14,5	0,0005
Tiolszubtilizin	0,84	6,3	0,0036

Megjegyzendő, hogy a geometrián túl más tényezőknek nincs jelentős befolyása az ion-párok reaktivitás különbségére [23]. Tehát nincs pozitív töltésű oldallánc egyik ion-pár szomszédságában sem, mely utánoszhatná az imidazolium-ion hatását a reagens karboxilát csoportjának vonzásában. Sőt, aminosav részek szterikus gátlása is elvethető, mivel nyilvánvaló az aktív helyek háromdimenziós modelljéből, hogy a kis alkilező ágensek könnyen megközelíthetik mindkét enzim reaktív kénatomját. Következésképpen az ion-párok eltérő geometriája a felelős legvalószínűbben a jelentős sebességkülönbségért a papain és tiolszubtilizin jóddacetátos alkilezési reakciójában. Az eredményeinkből szintén következik, hogy ezek az ion-pár geometriák meglehetősen merevek, és így megfelelő konformációban nem tételez-

hetünk fel torzult párokat, bár elvben a torzulást az aktív hely vagy/és a reaktáns flexibilitása kompenzálhatná. Ez magyarázhatja azt, hogy a tiolszubtilizin csak olyan aktivált észtereket képes hidrolizálni, amelyek jó távozó csoportokkal rendelkeznek és a tetraéderes átmeneti termék lebomlása nem igényel protonálást. Ellenben alkil észter és amid szubsztrátok esetén a távozó csoport az imidazolium csoport által történő protonálása pontos geometriát kíván az ion-pártól, ami a papain esetében teljesítve van, de a tiol szubtilizinnél nincs.

### Következtetések

Az enzimek röntgenkristallográfiás vizsgálata megbízható alapot biztosít a mechanizmus vizsgálatokhoz. A szerin proteinázok esetében számos, a katalízis szempontjából jelentős sajátosság mutatkozott meg, mint a katalitikus triád, az oxianion lyuk és a különböző reakciólépések közelítő sztereokémiája. Viszont, csak nagyon kevés esetben haladtak annyira előre a kutatások, mint a szerin proteinázok esetén. Például a karboxipeptidáz A esetén, melynek térbeli szerkezete már több mint egy évtizede ismert, még az alapmechanizmus sem világos [24]. Ezek a nehézségek a valódi enzim-szubsztrát komplexek és katalitikus intermedierek szerkezetmeghatározásának bonyolultságából származnak. Mégis lehet abban bizni, hogy a jövő kutatásai, a kísérleti technika további finomításával és újabb vizsgálatokkal ezen a téren, még részletesebb képet fognak nyújtani az enzim katalízis sztereokémiájáról.

### Összefoglalás

A szerin és a tiol proteinázok háromdimenziós szerkezetének ismeretében a katalízis sztereokémiáját vizsgáltuk. Eredményeink a következők: 1. A szerin-hisztidin-aszpartát triád inkább egy kiterjedt hidrogénkötés hálózatként működik, mint „charge relay” rendszerként. 2. Az általános bázis katalízis hiánya okozza a tiol proteinázok esetén az alapvető mechanizmus eltérést a szerin enzimekhez képest. 3. Az oxianion lyuk, mely a szubsztrát karbonil oxigénjét fogadja be, jelentős a szerin proteinázok katalízisében, de nem a tiol enzimekében. 4. A tiol-proteinázokban a merkaptid-imidazolium ion-pár a nukleofil, amely támadja a szubsztrátot. Az ion-pár helyes konformációja lényeges a katalízis szempontjából, amit negatív töltésű alkilező szerekkel igazoltunk.

### Summary

In the light of the 3-dimensional structures of serine and thiol proteinases, the stereochemistry of catalysis has been examined. The following results are discussed. 1. The serine-histidine-aspartate triad acts as an extended hydrogen bond network rather than a charge relay system. 2. Lack of general base catalysis in the case of thiol proteinases represents the basic difference from the mechanism of serine enzymes. 3. The oxanion hole which accommodates the carbonyl oxygen atom of the substrates, is important in the catalysis by serine proteinases but not by the thiol enzymes. 4. In thiol proteinases a mercaptide-imidazolium ion pair is the nucleophile which attacks the substrate. The proper conformation of this ion pair is essential for catalysis which is tested with alkylating agents bearing negative charges.



## IRODALOM

1. D. C. PHILLIPS, *Sci. Amer.*, 215/5, 78 (1966)
2. M. L. BENDER, F. J. KÉZDY, *Annu. Rev. Biochem.*, 34, 49 (1965)
3. J. KRAUT, *Annu. Rev. Biochem.*, 46, 331 (1977)
4. L. POLGÁR, B. ASBÓTH, J. Theor. Biol., 46, 543 (1974)
5. L. POLGÁR, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 7, 29 (1972)
6. E. M. BLOW, J. J. BIRKTOFT, B. S. HARTLEY, *Nature*, 221, 337 (1969)
7. L. POLGÁR, M. L. BENDER, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 64, 1335 (1969)
8. H. UMEYAMA, A. IMAMURA, C. NAGATA, M. HANANO, J. Theor. Biol., 41, 485 (1973)
9. S. SCHEINER, D. A. KLEIER, W. N. LIPSCOMB, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2606 (1975)
10. G. NÁRAY-SZABÓ, A. KAPUR, P. G. MEZEY, L. POLGÁR, előkészületben (1981)
11. D. M. HAYES, P. A. KOLLMAN, in *Jerusalem Symp. Quantum. Chem. Biochem. Vol. 12 „Catalysis in Chemistry and Biochemistry: Theory and Experiment”*, Pullman, B. ed. Reidel: Dordrecht, pp. 77 (1980)
12. H. UMEYAMA, S. NAKAGAWA, T. KUDO, J. Mol. Biol., 150, 409 (1981)
13. A. A. KOSSIAKOFF, S. A. SPENCER, *Nature*, 288, 414 (1980)
14. R. HENDERSON, J. Mol. Biol., 54, 341 (1970)
15. J. D. ROBERTUS, J. KRAUT, R. A. ALDEN, J. J. BIRKTOFT, *Biochemistry*, 11, 4293 (1972)
16. B. ASBÓTH, L. POLGÁR, előkészületben (1982)
17. L. POLGÁR, *Int. J. Biochem.*, 8, 171 (1977)
18. J. DRENTH, H. M. SWEN, W. HOOGENSTRAATEN, L. A. AE. SLUYTERMAN, *Koninkl. Nederl. Akademia van Wetenschappen, Proc. Series C.*, 78, 104 (1975)
19. J. DRENTH, J. N. JANSONIUS, H. KOEKOEK, B. G. WOLTERS, *Adv. Protein Chem.*, 25, 79 (1971)
20. S. D. LEWIS, F. A. JOHNSON, J. A. SHAGER, *Biochemistry*, 20, 48 (1981)
21. L. POLGÁR, *FEBS Lett.*, 47, 15 (1974)
22. L. POLGÁR, M. L. BENDER, *Adv. Enzymol.*, 33, 381 (1970)
23. P. HALÁSZ, L. POLGÁR, *Eur. J. Biochem.*, 79, 491 (1977)
24. W. N. LIPSCOMB, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77, 3875 (1980)



# A SZUBTILIZIN ÉS TIOLSZUBTILIZIN AKTÍV HELYÉNEK VIZSGÁLATA NAGYTÉREREJŰ PROTON MÁGNESES MAGREZONANCIÁVAL

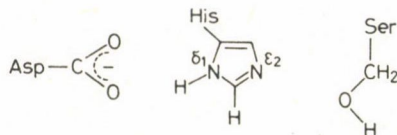
FRANK JORDAN,\* POLGÁR LÁSZLÓ és GUILLERMO TOUS

(\* Department of Chemistry, Rutgers, The State University of New Jersey, Newark, NJ 07102 USA;  
Enzimológiai Intézet, Biológiai Kutató Központ, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, Pf.7.

H—1502)

## Bevezetés

A szerin proteázok az enzimek jelentős osztályát képviselik, szerepük többek között az alvadási kaszkád és komplementje mechanizmusának aktiválása és degradálása. Több forrásból származó szerin proteázok eddig végzett röntgendiffrakciós vizsgálatok jelezték a megőrzött tercier struktúrát, amelynek a katalitikus helyén aszpartát (Asp), hisztidin (His) és szerin (Ser) van:



Korábban BLOW és munkatársai [1] azt javasolták, hogy a tagok triádja (azaz Asp, His, Ser), amit a kimotripszin, tripszin, elasztáz és szubtilizin katalitikus helyeinek röntgendiffrakciós vizsgálata során találtak, „charge relay”-t (töltésközvetítés) képeznek. Egy ilyen charge relay úgy működne, hogy a Ser-ről a proton a His-re, majd az Asp-ra menne át, így tehát nagy mértékben megnövelné a Ser nukleofil jellegét, ami ahhoz szükséges, hogy a peptid szubsztráttal kovalens intermedier alakulhasson ki [1]. A charge relay koncepciót kémiai alapokon megkérdőjelezték [2, 3, 4]. POLGÁR [3] azt javasolta, hogy a His  $N^{\delta_1}$ -én levő proton hidrogénkötésben van az Asp-tal, de átmenet nem történik. Polgár és Bender [2] azt is hangsúlyozta, hogy az  $N^{\delta_1}$ -H és Asp közötti hidrogénkötésnek nagyobb jelentőségűnek kell lenni a szerin OH és a szubsztrát között kialakuló tetraédes átmeneti állapot kialakulásában, amikor a His protonálva van, mint a szubsztrát-mentes enzimben. Még újabb kimotripszinnel szerzett kémiai bizonyítékok [5] és szubtilizinen végzett röntgendiffrakciós vizsgálatok [6] is ellene szólnak a His  $N^{\delta_2}$  és a Ser OH közötti hidrogénkötés létezésére a natív enzimben.

Újabban monoizopropil foszforiltripszinen végzett neutroindiffrakciós vizsgálatok arra mutatnak, hogy inkább a His a proton fogadó, mint az Asp [7].

A charge relay kérdését oldatban többféle módszerrel vizsgálták. NMR vizsgálatok a katalitikus hely His maradékának viselkedésére szorítkoztak. Ezek között voltak specifikusan  $^{13}\text{C}$ -His-nel dúított  $\alpha$ -litikus proteázok  $^{13}\text{C}$ -NMR vizsgálata [8]; specifikusan  $^{15}\text{N}$ -His-nel és  $^{15}\text{N}$ -His-nel dúított  $\alpha$ -litikus proteázok  $^{15}\text{N}$ -NMR vizsgálata [9]; a tripszin C2-H-jának  $^1\text{H}$ -NMR vizsgálata [10];  $N^{\delta 1}$ -H  $^1\text{H}$ -NMR vizsgálata [11, 12, 13, 14] és  $^{31}\text{P}$ -NMR vizsgálatok foszforilezett szerin proteázok esetén [15].

Célunk az, hogy összehasonlító NMR vizsgálatokat végezzünk a szubtilizin és tiolszubtilizin esetén. Az utóbbit a szerin enzim kémiai módosításával állítottuk elő [16, 17] és csak abban különbözik, hogy SH csoportot tartalmaz a katalitikus OH csoport helyett. Az így kapott cisztein egy merkaptid-imidazolium ion-párt képez a szomszédos His-nel [18]. Ez a töltéseloszlás hasonlít arra az ion-párra, mely a szerin enzim katalízise folyamán keletkezik, azaz arra, ami negatív töltésű tetraéderes addukt és a  $\text{HisH}^+$  között van. Ilyen összehasonlító vizsgálatok a szerin és cisztein enzimek között információkat szolgáltathatnak a katalitikus folyamat alap- és átmeneti állapotairól. A tiolszubtilizint a tiolproteázok modelljeként tekinthetjük, mint pl. a papain, melynek katalitikus helye Asp...His...Cys vagy Asn...His...Cys triádot tartalmaz. A megvizsgálandó kérdések: a „charge relay”, ahogy azt Blow és munkatársai [1] felvázolta, működik-e a szubtilizineken; vajon a His vagy az Asp maradék protonálódik pK 7 körül, mint ahogy azt a szubtilizin „steady state” (állandó állapotú) kinetikus mérései jelezték; s végül vajon az aktív hely katalitikus triádjának a mozgékonyága hasonló-e a különböző forrásokból származó szerin proteázokban az alap ill. átmeneti állapot-szerű szerkezetekben.

A szubtilizin és tiolszubtilizin aktív helyének viselkedését  $^1\text{H}$ -NMR vizsgálattal derítettük fel, a His  $N^{\delta 1}$ -jéhez kapcsolódó protont  $\text{H}_2\text{O}$ -ban mérve, a C2-H-t pedig  $\text{D}_2\text{O}$ -ban. Míg az előző módszerrel a katalitikus helynél a His  $N^{\delta 1}$  és az Asp közötti protont tanulmányozhatjuk, az utóbbi az összes hisztidinről ad információt.

### Kísérleti rész

#### Tiolszubtilizin szintézise

A Carlsberg- és BPN tiolszubtilizineket a megfelelő szerin enzimekből állítottuk elő. A nyers terméket Polgár [19] eljárásával tisztítottuk. A tisztított enzimet higanyszármazék formájában hosszabb ideig lehet tárolni. A szabad tiolenzimet kétszeres vagy ötszörös moláris feleslegű ditiotreitollal vagy merkaptotetanollal regeneráltuk. A tioltartalmat 5,5'-ditio-bisz(2-nitrobenzoát)-tal [20] titrálva határoztuk meg.



*NMR mérések*

Az  $^1\text{H}$ -NMR méréseket 80/20 (v/v)  $\text{H}_2\text{O}$ — $\text{D}_2\text{O}$ -ban végeztük 360 MHz-en korrelációs technikákat alkalmazva [21] vagy 500 MHz-en a Redfield-féle pulzus szekvenciát [22] alkalmazva a vízjel elnyomására. A 80/20  $\text{H}_2\text{O}$ — $\text{D}_2\text{O}$  oldatokban az összes mérést  $2^\circ\text{C}$ -on vagy alacsonyabb hőmérsékleten és a protein vizes puffertben való feloldásától számított 4 órán belül végeztük. A  $\text{D}_2\text{O}$ -ban felvett  $^1\text{H}$ -NMR méréseket gyors Fourier transzform mérismódban vettük fel 270, 360 és 500 MHz-en, a vízjelet a visszaradár HOD jel besugárzásával távolítottuk el. A His C2-H rezonanciák és a peptid gerinc NH-k rezonanciáinak átfedő tartományai miatt, az előzők asszignálása nehéz. A peptid NH csoportok deutériumcsereje csak az enzim hosszú (legalább 24 óra  $25^\circ\text{C}$ -on) inkubációjával pH 9-en érhető el. A felbontás javításának többi alternatívái a konvolúciós differencia módszer és a Carr—Purcell szekvencia csak ilyen lecserélési folyamat után volt használható. Az összes kémiai eltolódás értéket ppm-ben adjuk meg a kisebb térerők felé DSS-től (4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav nátriumsó) számítva.

**Eredmények és diszkusszió**

*A  $\text{H}_2\text{O}$ -ban megfigyelt alacsony térerejű rezonancia hozzárendelése  
a katalitikus helyhez*

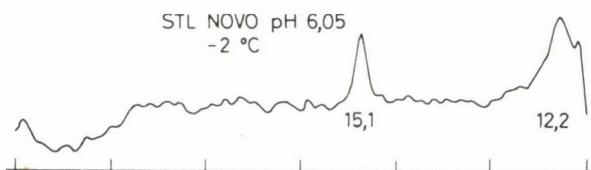
ROBILLARD és SHULMAN [11—13] és MARKLEY [14] szolgáltatott bizonyítékot arra, hogy a szerin proteázokban az alacsony térerejű rezonancia (15–18 ppm csökkenő térerők felé a DSS-től), amit ezen enzimeknek vizes oldatában észleltek az aktív hely His-jéhez tartozik, pontosabban az  $N^{\delta 1}$  protonhoz, ami hidrogénkötésben van az Asp-tal. Kimotripszin A $\delta$  esetén megmutatták, hogy a rezonancia a DSS-től csökkenő térerő felé 17–18 ppm-nél jelentkezik a protonált és 15 ppm-nél a neutrális hisztidinnél [11]. Az 1. táblázat a következő információkat közli a szubtilizin alacsony térerejű rezonanciájáról: 1. A rezonancia nem figyelhető meg egy pH-nál sem (5,5–9), sem a Carlsberg, sem a BPN szerin enzimek esetén (1. ábra) 1–2 mM koncentrációban még  $-2^\circ\text{C}$ -on sem. 2. A rezonanciákat minden pH-nál (6–8 felett) mindkét szerin enzimmél észlelhetjük, ha fenilbórsavat adunk hozzá (2. ábra), amint azt ROBILLARD és SHULMAN [13] leírta a BPN enzimre. 3. Ha a szerin enzimet először irreverzibilisen inaktiváljuk, fenilmetilszulfonil-fluoriddal, akkor fenilbórsav hozzáadása már nem váltja ki a rezonancia jelentkezését. Ez összhangban van a rezonanciának a katalitikus helyhez történő asszignációjával, mivel mindkét reagens a katalitikus szerint acilezi. 4. A Carlsberg és BPN enzimekből nyert tiolenzimek higanyszármazékai nem mutatnak alacsony térerejű rezonanciát pH 5,25 és 7,8 között. 5. A szerin enzimekből előállított tiolenzimek esetén is van alacsony térerejű rezonancia (megfigyelhető pH 5,38 és 8,37 között, 3. ábra). 6. Karboxamido-metiltioliszubtilizin BPN nem mutat



1. táblázat

Az alacsony térerejű  $^1\text{H}$  rezonancia megfigyelése a szubtilizin vizes oldatában  $0-2^\circ\text{C}$  között

Körülmények	pH tartomány	Kémiai eltolódás, ppm DSS-től, ha megfigyelhető
Szerin enzimek	5,34–8,73	nem megfigyelhető
Szerin enzimek hozzáadott fenilbórsavval	5,97–8,0	17,5
Szerin enzim fenilmetilszulfonil fluoriddal inaktíválva és fenilbórsav hozzáadásával	6,8	nem megfigyelhető
Tiolszubtilizinek higanysó	5,25–8,37	nem megfigyelhető
Szabad tiolszubtilizinek	5,4–8,2	17,7
Tiolszubtilizin BPN jódeacetamiddal inaktíválva	6,92	nem megfigyelhető
Szubtilizin BPN + <i>N</i> -acetyl-L-triptofán	5,5, 6,0	17,9
	6,5, 7,0	nem megfigyelhető
Szubtilizin BPN + <i>N</i> -acetyl-D-triptofán	6,0	nem megfigyelhető
Szubtilizin BPN + L-triptofánamid	6,0	nem megfigyelhető



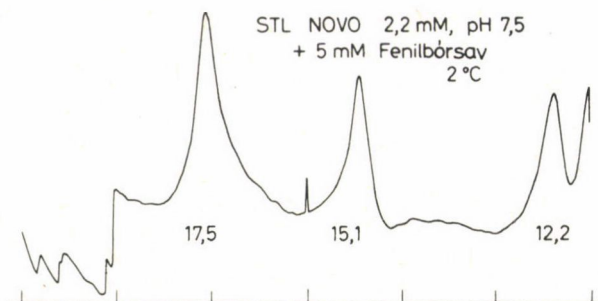
1. ábra. Szubtilizin BPN (Novo) pH 6,05,  $-2^\circ\text{C}$ ; 360 MHz  $^1\text{H}$  korrelációs NMR spektrum  $\text{H}_2\text{O}$ -ban. Kémiai eltolódások DSS-től csökkenő térerők felé, a jelek alatt feltüntetve, ppm-ben

alacsony térerejű rezonanciát olyan körülmények között, pH 6,95-nél,  $2^\circ\text{C}$ -on, ahol a tiolenzimek mutattak. A 4. és 6. feltételek nem teszik lehetővé tiolát anion kialakulását.

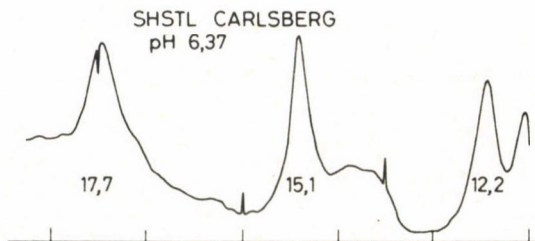
A 17,5 ppm-nél megfigyelt rezonanciák kémiai eltolódásai a szubtilizin-fenilbórsav komplexekben és 17,7 ppm-nél a tiolszubtilizinekben széles pH tartományban, azt sugallják, hogy ezek a rezonanciák egy protonált hisztidinium species  $\text{His-N}^{\delta 1}\text{-H}$ -hoz tartoznak. Ez azt is magában foglalja, hogy a stabil hidrogénkötés észlelése a  $\text{His-N}^{\delta 1}\text{-H}$  és Asp között szubtilizin származékokban csak akkor lehetséges, ha egy közeli negatív töltés stabilizálja a hisztidiniumot, azaz a  $\text{His N}^{\epsilon 2}$ -jén egy második proton is van. Ennek a rezonanciának a megfigyelhetősége függ az  $\text{N}^{\delta 1}\text{-H}$  és az oldószer hidrogénjei közti cserélődés sebességétől. Ha ez a sebesség túl nagy az NMR időskálán a rezonancia túl szélessé válik ahhoz, hogy megfigyelhető legyen.

A tiolszubtilizinben a DSS-től csökkenő térerő felé 17,7 ppm-nél jelentkező protonált hisztidinre jellemző rezonancia a következőkre enged következtetni: a) a protonált hisztidinium széles pH tartományban létezik, amelyben a tiol disszociált formáját már POLGÁR [18] leírta, így a tiolát-hisztidinium ion-pár létezése két teljesen különböző módszerrel nyert megerősítést; b) a tény, hogy a tiolszubtilizinekben és a

fenilbórsav komplexekben (átmeneti állapot analógok, l. [23]), a rezonancia megfigyelhető, de a natív szerin enzimekben nem, arra mutat, hogy a hidrogénkötés a His  $N^{\delta 1}$  és  $\text{AspCO}_2^-$  között stabilabb és valószínűleg még jelentősebb a tetraédes átmeneti termék kialakulásában, mint az enzimek szubsztrát mentes állapotában.



2. ábra. Szubtilizin BPN (Novo) pH 7,5, 2 °C, 2 mM, 5 mM fenilbórsav jelenlétében; 360 MHz,  $^1\text{H}$  korrelációs NMR spektrum  $\text{H}_2\text{O}$ -ban. Kémiai eltolódások DSS-től csökkenő téreörök felé, a jelek alatt feltüntetve ppm-ben



3. ábra. Tiolszubtilizin Carlsberg pH 6,37, 2 °C (merkaptóetanollal felszabadítva a higany származékból); 360 MHz  $^1\text{H}$  NMR spektrum  $\text{H}_2\text{O}$ -ban. Kémiai eltolódások DSS-től csökkenő téreörök felé, a jelek alatt feltüntetve ppm-ben

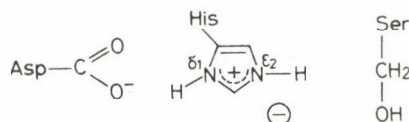
Véleményünk szerint a tény, hogy a natív szubtilizin nem mutatja az alacsony térerejű rezonanciát, míg a kimotripszin A $\delta$  azonos körülmények között igen [12], inkább ennek a hidrogénkötésnek változó stabilítását tükrözi a különböző szerin proteázokban, mintsem annak meglétét vagy hiányát.

Ez a következtetés azt is sugallja, hogy a His mobilitása az aktív helyen különböző lehet, különböző szerin proteázokban azonos körülmények között. Ezt a hipotézist kísérletileg is alátámaszthatjuk. A legújabb kutatások az acil-kimotripszin dezacilezésén [5] szintén arra az eredményre vezettek, hogy az  $\text{AspCO}_2^-$  és His  $N^{\delta 1}$ -H közti kölcsönhatás különböző erősségű (itt különböző stabilitású hidrogénkötésekről beszéltünk) és inkább a His köti meg a protont a katalízis folyamán, mint az Asp. Konklúziói teljes összhangban vannak az általunk elértekkel.

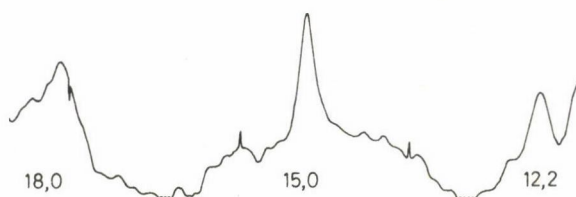


*A hidrogénkötés stabilizációjának sztereospecifikus jellege  
a katalitikus helynél*

Miután bebizonyítottuk, hogy a tiolszubtilizinekben és a szerin enzimek fenilbórsav komplexeiben a His  $N^{\delta 1}$ -H és  $\text{AspCO}_2^-$  közti hidrogénkötést a közeli His  $N^{\epsilon 2}$ -H negatív töltése stabilizálja, felmerült a kérdés, hogy vajon bármilyen negatív töltés a katalitikus triád közelében képes-e stabilizálni ezt a hidrogénkötést.



Abban a két esetben, amelyekben a hidrogénkötés különösen stabil, a negatív töltés a kovalensen kötött szerin maradékból származik. Ezért szóba jöhet reverzibilis inhibitorokat vizsgáltuk. Ezekhez a kísérletekhez Robillard és Shulman [13] észlelései adták az indítást, mely szerint 0,1M *N*-acetyl-L-triptofán kiváltja az alacsony térerejű rezonanciát 2 °C-on pH 6-nál szubtilizin BPN-ben. Kimotripszin Aδ-ban a rezonancia pH 7 felett is megmarad, viszont az inhibitor koncentrációját 0,5M-re kellett emelni a növekvő pH miatt csökkenő kötési állandó miatt [24]. Először elhatároztuk, hogy bizonyítjuk a kölcsönhatás létét a szubtilizin esetén. A három hasonló inhibitor, *N*-acetyl-L-triptofán, *N*-acetyl-D-triptofán és L-triptofánamid közül csak az első okozott alacsony térerejű rezonanciát 0,1M-os oldatban pH 6-nál 2 °C-on (4. ábra).



4. ábra. Szubtilizin BPN pH 6,1 0,1M *N*-acetyl-L-triptofánban, 3 °C, 360 MHz  $^1\text{H}$  korrelációs NMR spektrum  $\text{H}_2\text{O}$ -ban. Kémiai eltolódások DSS-től csökkenő térerek felé, a jelek alatt feltüntetve ppm-ben

A 2. táblázat a három inhibitor esetén meghatározott „steady state” kinetikai paramétereket tartalmazza. Ámbár a  $K_i$  értékek meglehetősen hasonlóak (mindhárom kompetitív inhibitor) és az enzimet az alkalmazott NMR körülmények között telítettük az inhibitorral, csak az *N*-acetyl-L-triptofán volt képes az  $\text{AspCO}_2^-$  és His  $N^{\delta 1}$ -H közti hidrogénkötés stabilizálására. Továbbá a rezonancia helyzete a DSS-től számított 18 ppm közelében jellemző a protonált imidazol gyűrűre. Az *N*-formil-L-triptofán és kimotripszin [25] kölcsönhatásának háromdimenziós ábrázolása világo-



san mutatja, hogy ennek az inhibitornak a  $\text{CO}_2^-$  csoportja (közele rokona az *N*-acetyl-L-triptofánnak, aminek a kölcsönhatását szubtilizinnel itt tárgyaljuk), térben közel van úgy a His-hez, mint a Ser-hez, az aktív helynél töltés-töltés kölcsönhatást megengedve a hisztidinium  $\text{N}^{\text{H}^2}$ -H-jával. Robertus és munkatársai röntgendiffrakciós kristallográfiai adatokat közöltek a szubtilizin BPN benziloxikarbonilglicilglicil-L-tirozin nem kovalens komplexről [26]. Az L-tirozin szabad karboxilát csoportja szoros érintkezést mutat a katalitikus hely Ser 221 és His 64 tagjaival. Feltehetően a  $\text{CO}_2^-$  pozíciója

## 2. táblázat

A szubtilizin BPN *N*-acetyl-L-triptofánnal, *N*-acetyl-D-triptofánnal s L-triptofánammal történő inhibíciójának „steady state” kinetikai paraméterei szubsztrátként *p*-nitrofenilacetátot alkalmazva 30 °C-on<sup>a</sup>

Inhibitor	pH	$K_i$ (mM)
<i>N</i> -acetyl-L-triptofán	6,0	3,6
	7,0	6,6
	8,0	14,9
<i>N</i> -acetyl-D-triptofán	6,0	8,7
L-triptofánamid	6,0	$\sim 10^b$

<sup>a</sup> $K_M$  és  $V_{\text{max}}$  5,3 mM és 1,1 OD/perc pH 6-nál, 0,9 mM és 7,1 OD/perc pH 7-nél, 0,4 mM és 13,8 OD/perc pH 8-nál.

<sup>b</sup>Közelítő érték, szintén lassú szubsztrátként hat.

ebben az inhibitor-szubtilizin komplexben és a mi NMR kísérleteinkben alkalmazott *N*-acetyl-L-triptofán esetében teljesen analóg. Ebből a szempontból érdemes emlékeztetni arra, hogy egy ilyen elektrosztatikus kölcsönhatás energetikailag jelentős lehet az aktív helynél a His mozgási szabadságának csökkentéséhez. Míg a másik enantiomer (*N*-acetyl-D-triptofán) ugyan képes elfoglalni a kötőhelyet, de a karboxilát csoportja feltehetően messze van a katalitikus His oldalláncától.

Ezután az alacsony téreje rezonancia megjelenésének pH függését vizsgáltuk a szubtilizin BPN-ben 10 mM *N*-acetyl-L-triptofán jelenlétében 500 MHz-en. Míg a rezonancia pH 5,5 és 6,0-nál megfigyelhető volt, pH 6,5-nél kisebb lett és pH 7-nél túl szélessé vált ahhoz, hogy észlelhessük. Ez összhangban van a katalitikus hely His.H<sup>+</sup>-jának titrálásával. ROBILLARD és SHULMAN már beszámoltak ehhez némileg hasonló észlelésekről a kimotripszin Aδ esetén [12]. Ez a pH függés lehetőséget teremt arra, hogy a katalitikus His.H<sup>+</sup> pK-ját meghatározzuk egyszerűen csak elég nagy koncentrációjú (mondjuk 0,5M) *N*-acetyl-L-triptofán és 1–2 mM szubtilizin alkalmazásával 0 °C-on úgy, hogy a jel alatti területet a pH függvényében mérjük. Ilyen vizsgálatok már folyamatban vannak. Ez alkalmas módszer lehet a pK-k meghatározására, mielőtt jelentős autolízis történne.

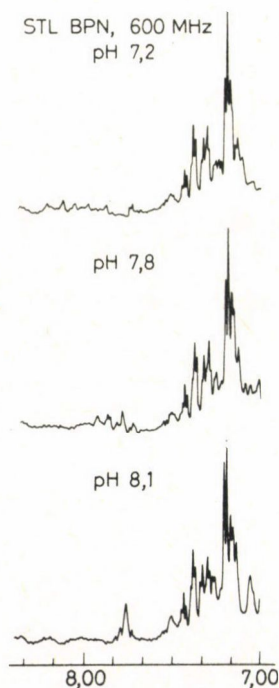
*A His C2-H rezonanciák  $^1\text{H}$ -NMR vizsgálata  $\text{D}_2\text{O}$ -ban*

A szubtilizin Carlsberg öt, a BPN hat hisztidint tartalmaz [27]. Az  $^1\text{H}$ -NMR spektrum aromás tartományában az enzimek egyes C2-H rezonanciáinak megfelelő primer szekvencia számhoz történő hozzárendelése több lépést igényel. Először a 7,5–9,0 ppm (DSS-től az alacsony térerők felé) tartományt meg kell szabadítani a peptid NH rezonanciáktól. Ez rendszerint nem probléma, de a szerin proteázok  $^1\text{H}$ -NMR spektrumaiban bosszantó nehézség. Mivel pH 5,5–6 alatt a szubtilizin irreverzibilisen denaturálódik, enyhén bázikus  $\text{D}_2\text{O}$ -t kell alkalmazni a gerinc NH-k ND-re való cseréléséhez. Egy további nehézség az, hogy a gerinc NH-k és az oldószert deuteronjainak cserélődése alatt a His C2-H-ja is D-re cserélődhet. Mivel tudjuk, hogy az imidazol C2-H-ja a hisztidinben a pH-tól függetlenül cserélődik, pK (mondjuk 8) felett, míg az amid NH-cserélődési sebessége lineárisan nő az  $\text{OD}^-$  koncentrációval, célszerűnek látszik a gerinc NH-kat magas pH-n lecserélni. Mi 9–9,5  $\text{pH}_{\text{app}}$  értéket (üvegelektóddal mérve  $\text{D}_2\text{O}$ -ban) alkalmaztunk erre a célra. Eddig azt találtuk, hogy  $\text{pH}_{\text{app}}$  9-nél Tris vagy  $\text{NaHCO}_3$  pufferekben az aromás tartomány 20–25 °C-on 48 órán belül kitisztul. 24 órán belül ezen körülmények között a spektrumok már használhatók. Ennek oka az, hogy a visszamaradó rezonanciák 7,5 és 9,0 ppm közül csak a His C2-H jelei mutatnak pH függő kémiai eltolódást. Elég nagy mágneses tereknél (360 MHz vagy még jobban 500 MHz) a gerinc NH-k egyedi jelei szintén tisztán megkülönböztethetők, mivel ezek dublettek (a C2-H-tól felhasadva), míg a His C2-H-ok jelei szingulettek. Néhány spektrumot és a His C2-H rezonanciákból levont következtetéseket fogjuk előadni a következőkben. Eddig még nem sikerült a szubtilizin katalitikus helyének His 64 tagjához tartozó rezonanciát egyértelműen asszignálni. Viszont világos, hogy a primer szekvencia számokhoz az egyértelmű asszignáció végső sikerét csak a gerinc NH-k előzetes lecserélésének és valamilyen felbontásjavító eljárás kombinációjával érhetjük el [28].

Némi sikert értünk el 270 MHz-en. A legtöbb pH-nál 5,5 és 7,7 között öt különálló C2-H rezonancia látható a szubtilizin BPN-ben. Ezek kémiai eltolódás értékei 7,7 ppm-től (DSS-től számítva), bázikus körülmények között (pH 8 fölött), 8,6 ppm-ig pH 6 alatt változnak. A titrálásokból nyilvánvaló volt, hogy mind az öt rezonancia pK  $7 \pm 0,5$  körüli értékű, egyik sem nagyon szokatlan. Egy érdekes anomáliát találtunk. Minden mintában (nagy számú) a szubtilizin BPN-t és Carlsberget, tiolszubtilizin BPN-t és Carlsberget is beleértve, minden alkalmazott térerőnél (270, 360, 500 és 600 MHz) 7,72 ppm-nél volt egy rezonancia, ami független volt a pH-tól. Míg alacsonyabb térerőknél (270 és 360 MHz) nem volt teljesen világos, 500, ill. 600 MHz-nél ez a jel egyértelműen dublett volt ( $J = 6 - 7$  Hz). Ezért ezt nem lehet a His C2-H-hoz rendelni. Ha gerinc NH volna, akkor nagyon védett környezetben kellett volna lennie, mivel semmilyen körülmények között (még hosszú inkubációval sem pH 9-nél) sem tűnt el. Néhány vizsgált mintában volt 8,44 ppm-nél is egy pH független rezonancia. Feltesszük, hogy ez akár autolizálódott és (denaturálódott) vagy sav által denaturálódott anyaghoz rendelhető.

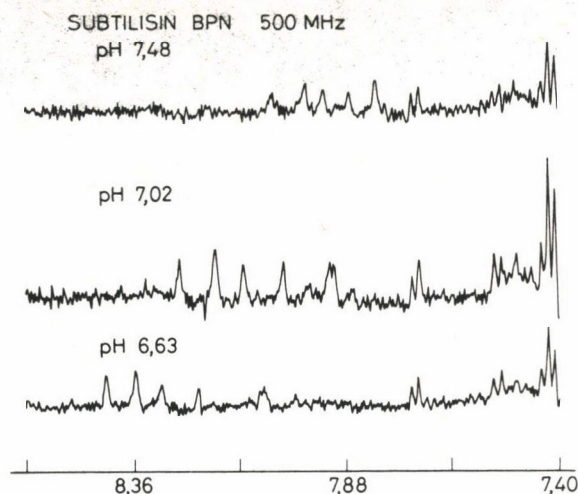


Kiválasztott 360, 500 és 600 MHz-es spektrumok jelezték, hogy a szubtilizin BPN öt tiszta jelet ad, mely pH függő. Az 5. és 6. ábrán 600 és 500 MHz-es spektrumokat mutatunk be. Még meggyőzőbb az a tény, hogy ugyanazon a pH-n a szubtilizin BPN és Carlsberg spektrumai egymásra helyezhetőek (7. ábra). Ez két, eddig fel nem ismert tényre mutat rá. Először annak a ténynek ellenére, hogy a két forrásból származó enzim primer struktúrája 83 maradékban eltérő [27], a tercier struktúráiknak nagyon hasonlónak kell lenni az öt hisztidin különböző pH-n mért kémiai eltolódásainak szuperpozíciójának megfelelően. Másodszor, rögtön arra a következtetésre lehet jutni, hogy a His 17 a szubtilizin BPN-ben az, amelynek C2-H rezonanciáját nem lehet megfigyelni. Ennek egy vagy két oka lehet: vagy olyan környezetben van, melyben az oldószer deuteronjaival lecserél 24 órán belül szobahőfokon, vagy nagyon árnyékolt környezetben van nagyon rövid spin-spin relaxációs idővel és a rezonancia túl széles ahhoz, hogy detektálható legyen. A His C2-H és az oldószer deuteronjai közti csere előbb tárgyalt mechanizmusa és cserélődési sebessége alapján a második magyarázat tűnik valószínűbbnek. Mind az öt C2-H rezonancia titrációs viselkedése minden alkalmazott mágneses térerőnél azt jelzi, hogy mindegyik  $pK$ -ja  $7 \pm 0,5$  körül van. Ez öt rezonancia között kell lennie a katalitikus hely His-je jelének is. Ezért a katalitikus His-nek is  $pK$   $7 \pm 0,5$  értékkel kell

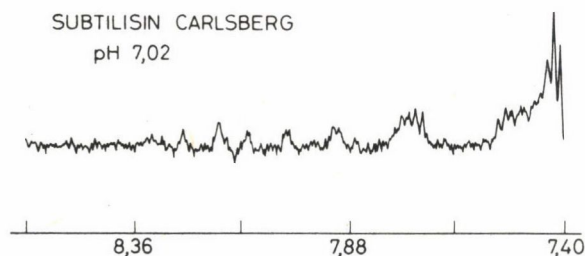


5. ábra. Szubtilizin BPN; 2 mM D<sub>2</sub>O-ban; 30 °C; 600 MHz <sup>1</sup>H korrelációs spektrum. Kémiai eltolódás tartomány 7–8,33 ppm, alacsony térerők felé DSS-től





6. ábra. Szubtilizin BPN; 2mM D<sub>2</sub>O-ban; 30 °C; 500 MHz <sup>1</sup>H Fourier transzform spektrum. Kémiai eltolódások DSS-től csökkenő térrők felé, a jelek alatt feltüntetve ppm-ben. Konvolúciós differencia paraméterek: 1, 4, 0,95



7. ábra. Szubtilizin Carlsberg; kb. 2 mM D<sub>2</sub>O-ban pH 7,02-nél 5 mM fenilbórsav hozzáadása mellett 30 °C; konvolúciós paraméterek 1, 4, 0,95. A rezonanciák kémiai eltolódásai ugyanazon a pH-n (0,02 pH egységen belül) azonosak voltak a fenilbórsav hozzáadása nélkül észleltekkkel

rendelkeznie, úgy a BPN szubtilizinben, mint a Carlsberg szubtilizinben is. A kísérletek a katalitikus His azonosítására 10 mM fenilbórsav és 0,5M bórsav jelenlétében végzett titrálásokat foglalt magában. Feltehetően a középső jel az az ötből, amelyik a katalitikus helyhez rendelhető, mivel fenilbórsav hozzáadásával ennek a jelnek csökkent az intenzitása és kis új jel bukkant fel 8,34 ppm-re a DSS-től (7. ábra). Végül a tiolszubtilizin His C2-H tartomány FT spektrumát felvéve azt találtuk, hogy az azonosítható rezonanciához a kémiai eltolódása nagyon hasonló a szerin enzimeknél találtakhoz ugyanazon a pH-n jelezve azt, hogy a kémiai módosítás (Ser-t Cys-re változtatva) a protein bruttó konformációját nem változtatta meg, összhangban a kinetikai vizsgálatokkal [29].

### Következtetések

Igazoltuk, hogy a szubtilizinek katalitikus helyén a His  $N^{\delta 1}$ -H és az Asp hidrogénkötés az  $N^{\epsilon 2}$  melletti oxianion nagymértékben stabilizálja. A tiolszubtilizinekben a His imidazolján van a hidrogén pH 6 és 8 között, ugyanígy a szerin enzimek fenilbórsavas kovalens származékaiban is, valamint pH 6,5-ig a szerin enzimek nem kovalens *N*-acetyl-L-triptofán komplexében is. Az alacsony térerejű rezonancia kémiai eltolódásának megfelelően  $H_2O$ -ban mindezek a körülmények inkább a His, mint az Asp protonálódását igazolják, ami összhangban van az  $\alpha$ -litikus proteázok  $^{15}N$  vizsgálatával [9] és az inaktivált tripszin neutrodiffrakciós eredményeivel [7]. Továbbá azt is jelzik az eredmények, hogy a katalitikus intermedierben (amelyben  $- + -$  töltés eloszlás van, mint a tiolszubtilizin és szerin enzim fenil-bórsavas komplex katalitikus triádjában) a protonnak szintén az imidazolon kell lennie. Ezért a charge relay [1] működése nem nagyon valószínű a szubtilizin katalizálta folyamatokban.

A His C2-H-k viselkedéséből szerzett bizonyítékok azt is jelzik, hogy a katalitikus His-nek a  $pK_a$ -ja a normális  $7 \pm 0,5$ . Végül megmutattuk, hogy a His- $N^{\delta 1}$ -H és Asp közötti hidrogénkötés stabilizációja a katalitikus helynél sztereokémiai kontroll alatt áll és a His mobilitása a katalitikus helyen különböző lehet a szerin proteázok között.

### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁSOK

A kutatásokat Rutgersben a Charles és Johanna Busch Fund és a Rutgers Research Council támogatták. A nagy térerejű  $^1H$ -NMR vizsgálatok nagy részét az University of Pennsylvania (360 MHz NIH Grant RR 542 támogatás) és a MIT Bitter Magnet Laboratóriumokban (500 MHz, NIH RR 995 és NSF szerződés C-670 támogatás), a Carnegie-Mellon Universityn (600 MHz, NIH támogatás) és kezdetben az University of Oxford, Dept. of Biochemistryn történtek. F. J. hálás G. G. McDONALD, D. REUBEN, J. DADOK és A. A. BOTHNER-BY-nek és R. A. DWEK-nek a fent nevezett laboratóriumokból a segítségükért és a szíveségükért.

### Összefoglalás

A szerin proteázok vizes oldatában talált nagyon alacsony térerejű  $^1H$ -NMR rezonancia jellemző a Ser...His...Asp katalitikus triád imidazolium és aszpartát csoportjai között kialakuló hidrogénkötésre [11]. A natív szubtilizinekben nincs ilyen rezonancia (még  $-2^\circ C$ -on és pH 6-nál sem), de a tiolszubtilizinekben, valamint a szerin enzimek fenilbórsav származékaiban jelen van. A His a tiolszubtilizin katalitikus helyén pozitív töltésű pH 5,6 és 8,4 között, így jelezve a nukleotid-imidazolium ion-pár létezését a katalitikus helyen. A stabil hidrogénkötés az Asp és His között a tiolenzimben és a szerin enzim fenilbórsav származékában valószínűleg létezik és legnagyobb jelentősége valószínűen a szerin enzim és szubsztrátja között kialakult tetraédes átmeneti állapotban van és hasonló  $- + -$  töltéseloszlással rendelkezik. Ilyen töltéseloszlás létrejöttének sztereokémiai feltételeit bemutattuk: a szubtilizin *N*-acetyl-L-triptofánnal telítve az említett rezonanciát mutatja, *N*-acetyl-D-triptofánnal és L-triptofánnal viszont nem (mindhárom a szerin enzim kompetitív inhibitora). A rezonancia tartomány pH függése *N*-acetyl-L-triptofán jelenlétében 7 körüli  $pK_a$ -t tesz lehetővé a katalitikus His-re. A His C2-H-k kémiai eltolódásának pH függése a szubtilizinben (beleértve a katalitikus hely His-jét is), azt mutatja, hogy mindegyik  $pK_a$  értéke  $7 \pm 0,5$ .



## Summary

The very low field  $^1\text{H}$  NMR resonance found in aqueous solutions of serine proteases is characteristic of the hydrogen bond between the imidazolium and aspartate groups of the catalytic triad Ser...His...Asp [Robillard, G. and Shulman, R. G., (1972) *J. Mol. Biol.* 71, 507–511]. No such resonance was found in native subtilisins (even at  $-2^\circ\text{C}$  and pH 6.0) but was present in thiolsubtilisins and in the phenylboronic acid derivatives of the serine enzymes. The His at the catalytic site of thiolsubtilisin carries a positive charge between pH 5.6 and 8.4 implying the existence of a mercaptide-imidazolium ion-pair at the catalytic site. The stable hydrogen bond found between Asp and His in the thiolenzyme and in the phenylboronic acid derivative of the serine enzyme probably exists and is likely most important in the tetrahedral transition state formed between serine enzyme and its substrate and bearing a similar  $- + -$  charge distribution. The stereochemical requirements for creation of such a charge distribution were demonstrated: subtilisin with saturating *N*-acetyl-L-tryptophan gave rise to the said resonance, with *N*-acetyl-D-tryptophan and L-tryptophanamide did not (all three are competitive inhibitors of the serine enzyme). The pH dependence of the area of the resonance in the presence of *N*-acetyl-L-tryptophan suggests a  $pK$  near 7 for the catalytic His. The dependence of the chemical shifts of the His C2-H's in subtilisins (including that at the catalytic site), indicate that all possess  $pK_a$ 's of  $7 \pm 0.5$ .

## IRODALOM

1. D. M. BLOW, J. J. BIRKTOFT, B. S. HARTLEY, *Nature*, 221, 337 (1969).
2. L. POLGÁR, M. L. BENDER, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 64, 1335 (1969).
3. L. POLGÁR, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 7, 29 (1972).
4. G. A. ROGERS, T. C. BRUCE, *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 2473 (1974).
5. S. E. HAMILTON, B. ZERNER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 103, 1827 (1981).
6. J. KRAUT, *Annu. Rev. Biochem.*, 46, 331 (1977).
7. A. A. KOSSIAKOFF, S. A. SPENCER, *Nature*, 228, 414 (1980).
8. M. W. HUNKAPILLER, S. H. SMALLCOMBE, D. R. WHITAKER, J. H. RICHARDS, *Biochemistry*, 12, 4732 (1973).
9. W. W. BACHOVCHIN, J. D. ROBERTS, *J. Amer. Chem. Soc.*, 100, 8041 (1978).
10. J. L. MARKLEY, M. A. PORUBCAN, *J. Mol. Biol.*, 102, 487 (1976).
11. G. ROBILLARD, R. G. SHULMAN, *J. Mol. Biol.*, 71, 507 (1972).
12. G. ROBILLARD, R. G. SHULMAN, *J. Mol. Biol.*, 86, 519 (1974).
13. G. ROBILLARD, R. G. SHULMAN, *J. Mol. Biol.*, 86, 541 (1974).
14. J. L. MARKLEY, *Biochemistry*, 17, 4648 (1978).
15. M. A. PORUBCAN, W. M. WESTLER, I. B. IBANEZ, J. L. MARKLEY, *Biochemistry*, 18, 4108 (1979).
16. K. E. NEET, D. E. KOSHLAND, Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 56, 1606 (1966).
17. L. POLGÁR, M. L. BENDER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 88, 3153 (1966).
18. L. POLGÁR, *FEBS Letters*, 38, 187 (1974).
19. L. POLGÁR, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 11, 81 (1976).
20. G. E. ELLMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70 (1959).
21. J. DADOK, R. F. SPRECHER, *J. Magn. Reson.*, 13, 243 (1974).
22. A. G. REDFIELD, S. D. KUNG, E. K. RALPH, *J. Magn. Res.*, 19, 114 (1975).
23. D. A. MATTHEWS, R. A. ALDEN, J. J. BIRKTOFT, S. T. FREER, J. KRAUT, *J. Biol. Chem.*, 252, 8875 (1977).
24. C. H. JOHNSON, J. R. KNOWLES, *Biochem. J.*, 101, 56 (1966).
25. T. A. STEITZ, R. HENDERSON, D. M. BLOW, *J. Mol. Biol.*, 46, 337 (1969).
26. J. D. ROBERTUS, J. KRAUT, R. A. ALDEN, J. J. BIRKTOFT, *Biochemistry*, 11, 4293 (1972).
27. E. L. SMITH, F. S. MARKLAND, C. B. KASPER, R. J. DELANGE, M. LANDON, W. H. EVANS, *J. Biol. Chem.*, 241, 5974 (1966).
28. I. D. CAMPBELL, C. M. DOBSON, R. J. P. WILLIAMS, P. E. WRIGHT, *FEBS Letters*, 57, 96 (1975).
29. I.-H. TSAI, M. L. BENDER, *Biochemistry*, 18, 3764 (1979).



## SZERKEZETI ÉS ENERGETIKAI TÉNYEZŐK SZEREPE A BIOLÓGIAI KATALÍZISBEN

RUDOLF ZAHRADNIK, PAVEL HOBZA, JOACHIM SAUER

(*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences,  
12138 Prague 2, Csehszlovákia;*

*Institute of Hygiene and Epidemiology, Centre of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 10042 Prague  
10, Csehszlovákia;*

*Zentral Institut für physikalische Chemie der Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, NDK)*

### Bevezetés

A biológiai katalízis kulcsszerepet játszik az *in vivo* és *in vitro* körülmények között biológiai rendszerekben végbemenő kémiai átalakulásokban. A katalitikusan aktív anyagok szerkezeti szempontból egyaránt lehetnek kis vagy nagy molekulák. A biológiában az enzimek a legkitűnőbb katalizátorok [1, 2].

Mielőtt a téma részletes tárgyalásába belemennénk kíváncsiaknak tűnik, hogy a katalízisekről általában két kérdést felvessünk.

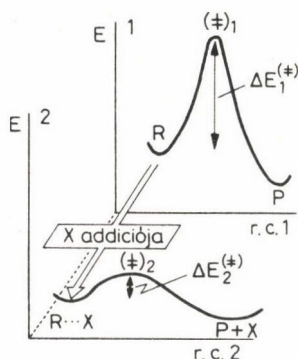
Az első kérdés: Honnan származik a reaktánsokat és termékeket elválasztó, a potenciális energia felületen levő gát?

A potenciálgát a teljes és részleges impulzusnyomaték megmaradási törvény megsértésének következménye. Az elektron impulzusnyomaték és az elektron spinnyomaték megmaradásának tétele alapvetően fontos: a törvénynek eleget tevő folyamatok megengedettek, míg az eleget nem tevők tiltottak.

A második kérdés: Hogyan lehet túljutni a gáton? A reakció termikus gerjesztése sok tiltott folyamat esetében nem elegendő. Továbbá, a potenciálgátat eltüntetni, csak egy általánosan elterjedt téveszme szerint lehetséges, mivel a gát a potenciálfelület velejárója. A magas gáton csak egyféleképpen lehet átjutni, ha a vizsgált molekulához egy megfelelő reagenst adunk, és ezáltal másik potenciális energia felületre térünk át (1. ábra). Erre számos lehetőségünk van: (I) reaktív iont vagy diiont képzünk, (II) elektronikusan gerjesztett állapotot hozunk létre, (III) konjugált savat, vagy bázist képzünk, (IV) megfelelő van der Waals komplexet képzünk, (V) külső, vagy helyi elektromos tér segítségével erősen polarizált reaktánst állítunk elő, (VI) katalizátorral képezünk komplexet. A reaktánsnak csak olyan módosításai jöhetnek számba, melyeknek során kisebb potenciálgáton keresztül jutunk el a kívánt termékhez. Annak ellenére, hogy számunkra elsősorban a katalizátorok érdekesek, hasznos, hogy az (I) – (V) pontok alatt felsoroltakkal is foglalkozunk, mivel ezek a katalizátor hatásának elemi lépései.

Az enzimek különleges helyet foglalnak el a katalizátorok között, mivel rendkívül sztereospecifikusak és igen hatékonyak. Nem törekszünk arra, hogy egy

adott enzim-szubsztrát rendszer működését mélyebben megértjük, helyett olyan közös jegyeket keresünk, melyek számos enzim-szubsztrát rendszerre jellemzőek. Erre a célra az enzim katalízis egy általánosan elfogadott alaptípusát használjuk fel (l. 1. sémát), feltüntetve az egyes lépéseket irányító hajtóerőt is.



1. ábra. Nemkatalitikus (1) és katalitikus (2) utak:  $\Delta E_2^{\ddagger} < E_1^{\ddagger}$ , X a katalizátor

Folyamat	Fő hajtóerő
a) a szubsztrát megközelíti az enzim aktív helyét (és egy vdW enzim-szubsztrát komplex képződik; sztereoselektív megkülönböztető lépés):	
Gyors megközelítés	vdW erők
b) Kémiai átalakulás:	
Gyors tényleges katalitikus lépés	kémiai erők
c) Végző állapot:	
A reakciótermék gyors kilökődése	vdW erők

1. séma. Az enzim-szubsztrát kölcsönhatás lépései

Nem lenne helyes, ha azt mondanánk, hogy a kezdeti fázisban (l. 1. séma a) pont) egyáltalán nem játszanak a kémiai erők szerepet. Azonban ennek a lépésnek a nagy sebességéből következik, hogy az az energiáját, amelyik a kiinduló („szabad” enzim, „szabad” szubsztrát) és a végző (enzim-szubsztrát komplex) rendszereket egymástól elválasztja vagy igen kicsi, vagy elhanyagolható. Ez van der Waals komplexeknél igen gyakori [3], de meglehetősen ritka kémiai reakciók esetében, leszámítva olyan speciális eseteket, mint a „lejtő” jellegű ion-molekula reakciókat. Mivel a folyamatokat kémiai szempontból kívánjuk tanulmányozni a szabadentalpia változással kell foglalkoznunk és nem az energia (vagy entalpia) változásokkal. Igen sok, az első



sémához tartozó folyamat viszonylag kis energia (aktiválási energia) változással jár, ez a  $\Delta H^0$  ( $\Delta H^\ddagger$ ) tényező mellett a  $T\Delta S^0$  ( $T\Delta S^\ddagger$ ) tényező fontosságát hangsúlyozza. Végül az enzimkatalizált folyamat nagy sebessége megköveteli, hogy a kémiai átalakulás gyorsan menjen végbe. Ehhez a következő két tényező föltétlenül hozzájárul: a reakció hely speciális geometriai elrendeződése, intenzív helyi elektromos tér hatása.

Mindezt figyelembe véve, a következő tárgyköröket választhatjuk ki:

1. A van der Waals erők részvétele és szerepe,
2. a van der Waals kölcsönhatás kiválasztó hatása,
3. az entrópia és hőkapacitás jelentősége és szerepe,
4. néhány enzim és enzim modell, valamint az aktuális kémiai átalakulás reakció helyének közös szerkezeti jellemzője,
5. erős helyi elektromos terek szerepe, orientáló hatásuk és aktuális kémiai átalakulást befolyásoló szerepük.

## A van der Waals erő részvétele és szerepe

Az élet bármilyen formája azonnal összeomlana, ha a gyenge, rendszerek közötti kölcsönhatások eltűnnének. Ebben az előadásban gyenge kölcsönhatásnak azokat nevezzük, melyek elektromos (és/vagy mágneses) multipólusok között lépnek fel, függetlenül attól, hogy a multipólusok állandóak, vagy ideiglenesen indukálódnak. Ezeket van der Waals kölcsönhatásoknak fogjuk hívni [3]; az irodalomban az ilyen típusú kölcsönhatásokat néha nemkovalens, gyenge, fizikai vagy másodlagos kölcsönhatásoknak hívják.

$$\begin{aligned} & \text{R} + \text{S} \rightleftharpoons \text{R} \dots \text{S}, \Delta E \\ & \quad \text{elsőrendű} \qquad \text{másodrendű} \\ \Delta E = \Delta E^{\text{pert}} = & \underbrace{E^{\text{C}} + E^{\text{ER}}}_{\text{elsőrendű}} + \underbrace{E^{\text{I}} + E^{\text{CI}} + E^{\text{D}}}_{\text{másodrendű}} + \text{kis tagok} + \text{magasabb rendű tagok} \\ & \quad \nwarrow \approx \swarrow \searrow \nearrow \\ \Delta E_{\text{SCF}}^{\text{var}} = & E(\text{R}''' \text{S}) - [E(\text{R}) + E(\text{S})] \doteq E^{\text{I}} + E^{\text{D}} \\ \Delta E^{\text{CORR}} \approx & E^{\text{D}} \text{ kölcsönhatási korrelációs energia közelítés} \\ \Delta E = & \Delta E_{\text{(SCF)}}^{\text{var}} + E^{\text{D}} \end{aligned}$$

2. séma. Perturbációs és variációs kifejezések az energia változásra [3]

Foglalkozzunk most a  $\Delta E$  kölcsönhatási energiával, amelyek az S szubsztrát és az R enzim közötti komplex képződést kíséri. A 2. sémában perturbációs és SCF variációs kifejezéseket adunk meg, melyek a kölcsönhatási energiák és azok közötti viszony kiszámítására szolgálnak [3]. Próbáljuk meg kiválasztani a perturbációs kifejezés azon tagjait, melyek a szubsztrát igen gyors behuzásáért, és a reakciótermé-



kek gyors kilökéséért felelősek (I. séma *a*, *c* lépések). Néhány speciális esetet leszámítva, a legtöbb biológiai rendszerben az elsőrendű tagokhoz képest a másodrendűek kicsik. Ez arra utal, hogy az *a*) lépésben a Coulomb vonzásnak és a *c*) lépésben a kicserélődési és/vagy a Coulomb taszításnak döntő szerepe van. Ezért olyan módszerekre van szükség, melyekkel ezek a tagok viszonylag könnyen és megbízhatóan kiszámíthatók. A Coulomb energia számítására megfelelő módszerek állnak rendelkezésre, de a kicserélődési taszítás számítása meglehetősen problematikus. A (korrekt) perturbációs kifejezés kiszámítása a kicserélődési taszításra biológiai molekulák esetében nem végezhető el.

Pillanatnyilag fontosabb lenne, ha megpróbálnánk kvalitatíven eldönteni, hogy elfogadható-e az a szerep, melyet a Coulomb- és a kicserélődési taszításnak tulajdonítottunk. Először is meg kell jegyezni, hogy a szubsztrát kritikus helyeit (pl. peptid- vagy észter-kötés) igen gyakran jellegzetesen nem egyenletes töltéseloszlás jellemzi és ezért helyi dipólusokkal kell számolnunk. Ugyanez vonatkozik a legkülönbözőbb enzimek aktív helyeire, ahol nemcsak az aminosavakon levő parciális töltéseket, hanem a viszonylag nagy pozitív töltésű fémkationt, vagy az  $\alpha$ -hélix peptidtől származó nagy elektromos dipólust is figyelembe kell venni. Ez egyben azt jelenti, hogy adottak a feltételek az erős Coulomb kölcsönhatásra. Bizonyos jelekből viszont arra lehet következtetni, hogy a kritikus helyen is kielégítőek a körülmények, mivel viszonylag alacsony a dielektromos állandó [4].

Az enzimatikussá átalakulás termékeinek az aktív helytől való gyors kilökődésben a kicserélődési taszításnak feltételezhetően fontos szerepe van, mely a következőképpen magyarázható: a szubsztrátban egy kötés felszakadása (mely olyan gyors is lehet, mint a kötés megszűnését kiváltó proton, vagy elektron átmenet) következtében bizonyos kritikus helyek túlszűfolttá válnak. Ez a kicserélődési taszító erők jelentős növekedését váltja ki: a reakció termékek igen gyorsan kilökődnek és a reakció hely alkalmassá válik a következő katalitikus folyamatra. Ez a taszító mechanizmus csak akkor lesz igazán hatékony, ha a szubsztrát tökéletesen odaillik az enzim aktív helyéhez. Abban az esetben, ha egy kisebb (kémiaileg rokon) szubsztrát lép kölcsönhatásba az aktív hellyel a mechanizmus nem működhet ilyen tökéletesen.

Meg kell említeni azt a lehetőséget is, hogy a kémiai átalakulás a töltések általános átrendeződésével jár együtt, oly módon, hogy egyes helyeken a Coulomb vonzás Coulomb taszításba csap át. Maga a taszítás, illetve a kicserélődési taszítással együtt felelős a kilökődési állapotért.

A fentieket az entrópia változás jelentősen befolyásolja. Némely esetben a végső szabadentalpia változás előjelét a  $T\Delta s^0$  tag határozza meg, azaz az illető folyamat entrópia kontrollált.

A vdW kölcsönhatásoknak a folyamat első fázisában valószínűleg többféle, de legalább kétféle szerepük van. Először kiválasztó (a kiválasztás különböző típusú megkülönböztetésen alapul), másodsor „előre gyártó” szerepük van (az aktivált komplex jellemző tulajdonságait hordozó szerkezet „előre gyártásáról” részletesebben a későbbiekben szólnunk).



### A van der Waals kölcsönhatások megkülönböztető szerepe

Megkülönböztető (vagy kirodiasztaltikus) kölcsönhatás ugyanolyan, vagy eltérő típusú enantiomerek közötti kölcsönhatások gyűjtőneve. A kölcsönhatások termékei fizikai tulajdonságokban (pl. olvadáspont, forráspont), adszorpciós jelenségekben, kémiai reakcióképességben különböznek [5]. Ezek a jelenségek a kémia legkülönbözőbb területén játszanak szerepet, de a biológiai reakcióképességben betöltött szerepük rendkívül fontos. Az irodalomban számos frappáns példa található, amely a (+) és (–), (vagy R és S) enantiomerek közötti kvalitatív biológiai aktivitás különbséget mutatja be.

Nagy a különbség két teljesen szabad „monomer” vákuumban végbemenő kirodiasztaltikus kölcsönhatása, és egy háromdimenziós polimer (királis centrum enzim) és egy szubsztrát kölcsönhatása között. Ami az előzőt illeti, a megkülönböztető kölcsönhatás pontos kvantumkémiai leírását Craig és Mellor adta meg [5]. Kimutatták, hogy a perturbációs leírás néhány tagja diszkriminatív (pl. a rezonancia kölcsönhatás, az elektromos és mágneses dipólusok közötti diszperziós kölcsönhatás), de minden esetben az  $R-R(S-S)$  kölcsönhatás  $\Delta E$  értéke csak kismértékben különbözik az  $R-S$  kölcsönhatásától. Tulajdonképpen a megkülönböztetés legtöbb esetben kisebb vagy összemérhető a 298 K-hez tartozó 2,4 kJ/mol értékű termikus energiával. Helyettesített etanol származékok [6] ( $CH_2CHXOH$ ,  $X=F, CN, C=CH, CH=CH_2$ ) azonos és ellentétes antipódjai által képzett dimerek esetében a legnagyobb energia különbséget (PCILO számítás szerint) a (+)–(+) és a (+)–(–) formák között  $X=F$  esetében találták, a számszerű érték 540 J/mol. A megkülönböztetési energia magasabb (egy nagyságrenddel) a kovalens kötéssel összekapcsolt két királis központot tartalmazó rendszerek esetében (pl. 2,3-diciano-butánok [5], 1,2-difluorhidrazinok [7]). Az utóbbi esetben (azaz az enzim-szubsztrát kölcsönhatásnál) a polimer királis centrumának csak az egyik oldalát tudja a támadó ágens megtámadni; a hárompontos kapcsolódás biztosítja az enzim-szubsztrát kölcsönhatás rendkívüli sztereoselektivitását.

A vdW kölcsönhatás nagymérvű szelektivitásának oka valószínűleg egy többlépéses folyamat. Foglalkozunk egy igen különleges, de rendkívül fontos esettel, mikor az enzim membránhoz kötött. Egy előzetes kiválasztási lépés a membrán mindkét oldalán megtalálható elektromos térben (kb.  $10^7$  V/m) megy végbe, a jelenség oka az, hogy az elektromos tér az elektromos dipólusokra irányító hatást fejt ki. Ez a tér felelős azért, hogy a szubsztrátszállítás felgyorsul. A membráncsatorna bevezető szakasza nagyság szerinti megkülönböztetést végez. A csatorna sinszerűen rávezet az enzim aktív helyére; ez a következő, és az egész folyamat specifikussága szempontjából döntő szakasz. A szubsztrát szerkezeti egységei és az aktív hely között kölcsönhatás lép fel. A szubsztrát csak egy negatív szabadentalpia változással,  $\Delta G_T^0 < 0$ , járó csoportképződésen által kötődhet. Nyilvánvalóan nem egyszerű ennek a feltételnek eleget tenni, mivel a negatív entalpia változást (mely a vonzó Coulomb, indukciós és diszperziós erők következménye) az entrópia csökkenés jelentős mértékben ellen-



súlyozza.\* Éppen ez a körülmény biztosítja a megkülönböztetés feltételeit. A megkülönböztető hatás sorrendje a következő: 1. nagyság szerinti megkülönböztetés; minden olyan szerkezeti egységet, melyek az aktív hely geometriája által meghatározott méretnél nagyobb a rendszer kiveti, 2. megkülönböztetés az aktív hely királis követelménye szerint, 3. megkülönböztetés, mely azon alapul, hogy a  $-\Delta H_T^0$  tag elég nagy ahhoz, hogy a  $T\Delta S_T^0$  tagot elnyomja. Ez különösen a szubsztrát olyan szerkezeti egységeire vonatkozik, amelyek igen hasonlítanak a helyes egységekre, de annál kisebbek; következésképpen a  $-\Delta H_T^0$  tag kisebb lesz, de a  $T\Delta S^0$  tag csak kismértékben változik. Emiatt megtörténhet, hogy nem érjük el a kívánt negatív  $\Delta G_T^0$  értéket. Továbbá csak egy optimális szubsztrát-aktív hely illeszkedés biztosítja a szubsztrát szabadsági fokainak maximális befagyasztását, mely tényező a következő (a tényleges kémiai lépés) hatékonysága szempontjából alapvetően fontos. Ez a negyedik megkülönböztető effektusnak tekinthető.

### Az entrópia és a hőkapacitás jelentősége és szerepe

Régóta elfogadott tény, hogy az entrópiának az enzím-katalízis néhány lépésében fontos szerepe van [2, 8] sokat kell még tenni azért, hogy elfogadtassuk az entrópiának a biológiai katalízis minden fázisában döntő szerepe van. Különös figyelmet kell fordítani az entrópia szerepére a folyamat első és utolsó fázisában. Még általánosabban fogalmazva, nincs a biológiában olyan folyamat, melyet energia analízis alapján megbízhatóan és teljesen értelmezni lehetne. Végül számos olyan folyamat és kölcsönhatás van, melyek entrópia-kontrolláltak (pl. elektromos multipólusok kölcsönhatása, egymásra halmozódás (stacking), hidrofób kölcsönhatások, hidrogén-hidas vagy töltés-átviteli komplexek keletkezése, a diszperziós erők kölcsönhatása; l. 1. táblázat).

A szubsztrát kötődése egy rögzített enzimen három transzlációs és három forgatási szabadsági fok vesztéssel jár együtt. A vesztesség entrópia csökkenést okoz. Az asszociáció következtében kialakuló hat rendszerközi vibrációs mód entrópia növekedést okoz; ez a növekedés jelentős mert az újonnan kialakult vibrációs módokhoz alacsony frekvencia tartozik, de még mindig nem elegendő ahhoz, hogy a fent említett vesztéséget pótolja.

Olyan folyamatok, melyekben fehérjék vesznek részt, gyakran nagy entrópia változással járnak. Ez egyben azt jelenti, hogy nagy hőkapacitásváltozás  $\Delta C_p$  is várható. Sturtevant [10] tanulmányozta a fehérje és a reakciópartner közötti kölcsönhatást kísérő nagy  $\Delta S$  és  $\Delta C_p$  eredetét. Ennek legfontosabb forrása a konformációs változások és a puha rendszerek közötti vibrációs módok képződése.

\* Teljesen szabad szubsztrát esetében az entrópia változás ellensúlyozó hatása még erőteljesebben jelentkezik, mint az általunk vizsgált példában, ahol egy csatornán halad keresztül a szubsztrát, és ennek következtében néhány haladó és forgó szabadsági fok „be van fagyva”.



1. táblázat

Különböző típusú vdW molekulák keletkezésének termodinamikai jellemzői (298 K, kJ/mol) [9]

vdW molekula	$\Delta E$	$\Delta H^0$	$T\Delta S^0$	$\Delta G^0$	K
Ar...ClF <sup>a</sup>	-2,70	-2,68	-19,84	17,16	0,001
HF...HF <sup>b</sup>	-15,91	-12,29	-22,37	10,08	0,017
H <sub>2</sub> O...H <sub>2</sub> O <sup>b</sup>	-27,11	-18,50	-21,46	2,96	0,303
Hangyasav dimer <sup>a</sup>	-66,94	-58,72	-49,86	-8,86	35,48

<sup>a</sup> Kísérleti értékek.<sup>b</sup> Számított: közeli Hartree—Fock értékek.

Továbbá a  $\Delta S$  és  $\Delta C_p$  értékek a hidrofób és elektrosztatikus kölcsönhatás változásokkal és a kölcsönhatások közben keletkező hidrogénhidakkal kapcsolatosak. A nagy  $\Delta C_p$  és  $\Delta S$  változásokkal járó folyamatok közös jellemzője az, hogy értékük erősen függ a hőmérséklettől.

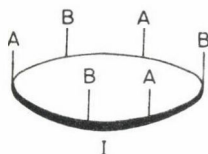
Az entrópiaváltozások számítógépes kiértékelésével kapcsolatban az alábbi megjegyzést kell tennünk. A helyzet kielégítő, azoknál a közönséges kémiai reakcióknál, ahol a statisztikus termodinamikán alapuló szokásos összefüggések lehetővé teszik, hogy a merev rotor — harmonikus oszcillátor — tökéletes gáz közelítésen belül kiszámítsuk az összes termodinamikai jellemzőt, beleértve az entrópiát is. Ezeket a jellemzőket kvantumkémiai eszközökkel előállított molekuláris konstansokból kaphatjuk meg. A  $\Delta S$  kiszámítása van der Waals rendszerekben elvben is kevésbé egyszerű, valódi vdW rendszerekben pedig meglehetősen nehéz. Ez nagyrészt azért van, mert a harmonikus közelítés nem alkalmazható az összes olyan molekulára, melyek erősen anharmonikusan mozognak (lágy vibrációk, belső forgás, kis gáton keresztül való inverzió, gyűrű-vetődés) és ezenkívül a forgási és rezgési partíciós függvények faktorizálása nem fogadható el többé. Ezekre a molekulákra a rezgési partíciós függvényt az egyedi energia szintekhez tartozó tagok összegzésével kell képezni.

A legkecsegtetőbb, de még mindig költséges közelítés a Monte Carlo és a molekuláris dinamika módszerek. Ezeknek az eszközöknek az igénybevételével nemcsak a kölcsönhatási energiákat, hanem a termodinamikai jellemzőket is megkaphatjuk [11, 12].

### Enzimek és enzimmodellek reakcióhelyeinek általános jellemzői és a tényleges kémiai átalakulás

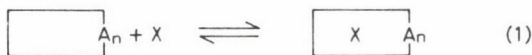
Számos biológiai aktív rendszer létezik, melyeknél a reaktív hely gyűrűs, üreg, illetve hasadék alakú; a kritikus terület gyakran hidrofób természetű. Például a hemoglobin aktív részei, a klorofil, B<sub>12</sub> vitamin, számos gyűrűs peptid (néhány ezek közül antibiotikus aktivitású) ionoforok és enzimek és ezek modelljeinek aktív helyei rendelkeznek ilyen tulajdonságokkal.

A közös szerkezeti jellemzőt leegyszerűsítve a 2. ábrán mutatjuk be, A és B szerkezetileg rokon, vagy azonos csoportokat jelentenek. A speciális elrendeződés (2. ábra) a megfelelő szubsztrát reaktivitását többféleképpen befolyásolja: 1. A funkciós csoportok igen nagy helyi koncentrációja jelentősen megváltoztathatja a kémiai egyensúlyt. Ez nem tipikus, nagy reaktivitású átmeneti termékek képződését és



2. ábra. Enzimek közös, leegyszerűsített szerkezeti modellje

átmeneti stabilizálódását segítheti elő. 2. Rögzített helyzetben pl. egy kör mentén történő komplex képződés  $n$  számú funkciós csoport és egy megfelelő ( $X$ ) között (1. egyenlet) erősen kedvezményezett az entrópia viszonyok szempontjából,  $n$  számú funkciós csoport szabad molekulával történő komplex képződésével (2. egyenlet) összehasonlítva:



3. Egy gyűrű, üreg, hasadék belsejében levő feltételek alapvetően különbözhetnek az oldatbeliektől. Különösen igen alacsony, vagy alacsony dielektromos állandójú, kisszámú és (szerkezetileg rögzített) fém kation közelsége hoz létre sajátos reakció körülményeket. 4. Rögzített (de nem teljesen merev) térbeli elrendeződés és térbeli alkat hozzájárul a feltételezett szubsztrát kiválasztásához, és amennyiben királis, a királis megkülönböztetéshez. 5. Az egyes csoportok donor-akceptor tulajdonságait a csoporton levő magános párokkal való kölcsönhatás jelentősen megnövelheti. A fent említett okok miatt az I-es szerkezetű rendszerekre és bármely más rokon szerkezetekre a „ciklokatalizátor” gyűjtő fogalmat használtuk. Az utóbbi időben W. P. Jencks [2] által bevezetett „Kirke-hatás” jól fedti a fentebb tárgyaltakat, ezért nincs értelme a „ciklokatalizátor” és A „ciklokatalízis” fogalmakat a továbbiakban használni.

Hol játszik a Kirke-hatás szerepet?

1. Ionoforok és csatorna képzők segítségével, a lipid membránokon keresztül történő ion szállításban. Ez transzport, azaz fizikai folyamat elősegítéseként fogható fel;

2. gyűrűs szerkezetű, pl. ciklopeptidek, különböző antibiotikumok biológiailag aktív vegyületek működésében;



3. modell enzimeknél, elsősorban ciklodextrinokban, azaz olyan rendszerekben, melyekben hengeralakú üreg van [14];

4. A korona éter kémiai területén is szerepet játszik, Cram és munkatársai erre a jelenségre a vendég-gazda kölcsönhatást használják [15, 16]. Ugyanezen szerzők mutattak rá az enzimek, nukleinsavak, antitestek (gazda), és a szubsztrát, inhibitor, kofaktor és antigén vendég közötti szelektív molekuláris komplexképződés közötti hasonlóságokra. Megkülönböztetett figyelmet szenteltek a gazda kiemelkedő szerkezetfelismerő képességére és kiralitására. A gazda megfelelő szerkezetét kielégítő feltételeket tizenhét pontban foglalták össze [15].

5. Különböző szubsztrát és különböző nagyságú ablakok ( $S_I$ ,  $S_{II}$ ,  $S_{III}$ ) közötti kölcsönhatásokban, így zeolitokban és szilikátokban is a fenti hatásnak szerepe van;

6. Az enzimek különböző zsebeiben, üregeiben, hasadékaiban.

TRAINOV és BRESLOW [17] legutóbbi vizsgálatai bizonyos mértékig megingatták azt a régi elképzelést, hogy az enzimatiszta értelemben vett katalízishez okvetlenül makromolekulára van szükség, mivel kis molekulákkal korábban nem sikerült a katalízist modellezni. A fenti szerzők kimutatták, hogy a béta-ciklodextrin *p*-nitrofenil-3-transzferrocenilpropionáttal történő acilezése kitűnő modell az észterek enzimkatalizált hidrolízisének első lépésére.  $10^6$  nagyságrendű sebességnövekedést sikerült elérni.

A tényleges kémiai átalakulás gyakran sav-bázis katalízis, vagy elektron átmenet jellegű; a végbemenő folyamat rendszerint kötés kialakulás vagy felszakadás, csoport átmenet vagy oxidációs-redukációs reakció. Ezen folyamatok részletes analizisét Eigen és Hammes végezték el [18]. Meggyőző bizonyíték gyűlt össze arra nézve, hogy a proton átmenet (függetlenül a hidratáltság fokától) rendszerint ugró mechanizmus szerint megy végbe, a megfelelő sebességi állandó  $10^{13} \text{ s}^{-1}$  nagyságrendű. A nagy izotóp effektus arra utal, hogy a proton átmenetben az alagút effektus is szerepet játszik. Ilyenfajta folyamatok átmenet-kontrolláltak. Bár az elektron-átmenet folyamatok rendszerint olyan gyorsak, mint a proton-átmeneti folyamatok (ennek indokát l. a [18]-as hivatkozásban), a gyakorlatban az előbbi mégis ritkábban jön létre, mivel az átmenet igen érzékeny arra hogy, a partnerek kölcsönös optimális orientációtól (konformációtól) mennyire térnek el.

Ismételten rámutattak arra, hogy az enzimkatalizált reakciók hagyományos értelmezése az abszolút sebességi elmélet keretén belül nem minden esetben helyes, mivel néha nem teljesül az összes szabadsági fok termikus egyensúlyára vonatkozó feltevés [19].

### Erős helyi elektromos tér hatása

Minden töltött részecskékből álló rendszer elektromos teret (mezőt) kelt maga körül. Ezt a teret úgy írhatjuk le, hogy a tér minden pontját megadjuk intenzitását ( $\epsilon$ ), vagy potenciálját ( $V$ ). Egy elektromos tér intenzitása helyett, egyszerűen magáról a térről beszélünk, ekkor mondhatjuk, hogy a tér a potenciál negatív gradiense:

$$\epsilon = -\text{grad } V. \quad (3)$$



Ha a tér inhomogén, a tér gradiensevel is leírható

$$\mathcal{F} = \text{grad grad } V \quad (4)$$

Általában a reagensekre a többi reakció partner által létrehozott tér hatást gyakorol. A helyi tér helyesen leírható, ha az alkalmazott kvantumkémiai modell megfelelő. Ha viszont a modell nem teljes valamilyen szempontból, akkor a helyi elektromos tér leírása sem kielégítő, annak ellenére, hogy a modell „kémiaileg tökéletes”. Ilyen helyzetekben a modell minősége javítható, ha az elektromos mezővel kapcsolatos  $V_{\text{ext}}$  potenciált kifejtett formában vesszük figyelembe. A  $V_{\text{ext}}$  értéket vagy egy Taylor sor (többpólusú kiterjesztés) első tagjaként, vagy közvetlenül pont töltések által keltett potenciálként vesszük figyelembe.

Az előbbi esetben

$$V_{\text{ext}}(\vec{r}) = V_0 - i\vec{r}_i - 1/2 \mathcal{F}_{ij} \Theta_{ij}, \quad (5)$$

ahol  $\varepsilon_i$  és  $\mathcal{F}_{ij}$  az elektromos tér és a tér gradiens összetevői,  $\vec{r}_i$  és  $\Theta_{ij} = 1/2(3\vec{r}_i\vec{r}_j - r^2\delta_{ij})$  dipólus kvadrupólus nyomaték operátorok. Ha a (6)-os egyenletben a tér-dipólus tagra korlátozódunk, a H-törzs és Hartree—Fock mátrix elemek, pl. az INDO módszer keretén belül maradva, az alábbi alakot öltik [20]:

$$H_{\mu\nu} = H_{\mu\nu}^0 - e\varepsilon \langle \chi_\mu | z | \chi_\nu \rangle \quad (6)$$

$$F_{\mu\nu} = F_{\mu\nu}^0 - e\varepsilon \langle \chi_\mu | z | \chi_\nu \rangle \quad (7)$$

ahol  $H_{\mu\nu}^0$  és  $F_{\mu\nu}^0$  külső elektromos tér hiánya esetén érvényes mátrix elemek,  $e$  az elektromos töltés,  $\varepsilon$  a térerő és  $\langle \chi_\mu | z | \chi_\nu \rangle$  pedig a  $z$  tengely irányába mutató elektromos mező vektorra vetített elektronikus sugár vektor mátrix elemei. A külső elektromos tér ilyen formában történő figyelembe vételének két hátránya van. Először is semmiféle szemiempirikus összes vegyérték elektron közelítés nem kielégítő, mivel a polarizációs függvényeket nem vettük figyelembe. Másrészt ezzel a módszerrel az elektromos teret homogénnek vesszük, ugyanakkor a valódi rendszerekben inhomogén terek működnek. Ennek ellenére ha a helyi mezők következtében bekövetkező változások irányáról csupán kvalitatív képet képet kívánunk kapni, a fent vázolt eljárás mégis kielégítő. Van egy másik szempont is, amit figyelembe kell vennünk.  $10^{10} \text{ V m}^{-1}$  nagyságú külső elektromos terek erősen befolyásolják a számított jellemzőket (pálya- és teljes energiák, gerjesztési energiák, töltéeloszlás, elektromos multipólus nyomaték, molekula geometria) és ezért meg kell határoznunk a megfelelő potenciális energia felületeken a stacionárius pontokat és azok tulajdonságait. Ahhoz, hogy ezt hatékonyan elvégezzük, egy megfelelő gradiens eljárás nagy segítségével ad.

A  $z$  irányú energia gradiens összetevői a következők [20]:

$$\delta E / \delta z_A = \delta E^0 / \delta z_A - e\varepsilon \left( \sum_{\mu \in A} P_{\mu\mu} - z_A \right) \quad (8)$$

ahol  $A$  index az  $A$  atomot jelenti, a többi szimbólum jelentése a szokásos.

Egy másik megközelítésben a környezet pont töltésekkel való ábrázolást

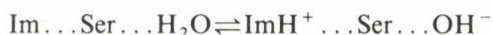
$$V_{\text{ext}}(\vec{r}) = \sum_i (q_i / \vec{r} - \vec{R}_i) \quad (9)$$

hozzáadjuk a kifejtett formában figyelembe vett alrendszer operátorához. Következésképpen nincs probléma az inhomogén terekkel, melyeket a (9)-es egyenlet helyesen ír le. A (9)-es egyenlet alkalmazására szemiempirikus, vagy nemempirikus szinten számos példát találunk. Az ily módon modellezett környezet a folyadék halmazállapotú oldószertől [21—23] a molekula kristályokon [21] és a mikroporózus szilárd anyagokon [24] keresztül az enzimekben levő aktív hely fehérje környezetéig [25—33] terjed. A közeg statisztikai szempontjait is érintő tanulságos beszámolót készített Tapia [25] újabban.

Erős elektromos terek az ionizációs potenciált jelentősen csökkentik, növelik az elektron affinitást, a leghosszabb hullámhosszú elektron átmeneteken vörös eltolódást okoznak, és erősen növelik a reakciókészséget. Másodrendű perturbációs leírásmód segítségével magyarázatot nyerünk arra, miért nő meg a monomolekuláris bomlásra való hajlam.

Az élő membránokban működő potenciál-gradiensek valószínűleg nem elég magasak ahhoz, hogy a különböző biomolekulák kémiai reakcióképességét kellő mértékben befolyásolják, de arra elegendők, hogy kiterjedten befolyásolják például a makromolekulák irányítottaságát és a membránon való keresztülhaladásukat [34]. Ez összekapcsolódhat az enzim aktív helye mellett történő elhaladással és fiziológias körülmények között az enzim hatékonyság drámai növekedését okozhatja. A fentebb idézett munkában [34] a potenciál-gradiensnek a tautomeria egyensúlyra való hatását elemezték, a valódi feltételekre érvényes becslés igen jelentős eltolódásra utal, ez lehet felelős a membrán érzékenységeért.

A fehérje környezet elektromos terének szerepét Tapia tárgyalta [25] a fent említett elméleti eljárásokkal kapcsolatban. Tulajdonképpen a szerző a jelenséget általánosabb, a reakció teret is figyelembe vevő nézőpontból tárgyalta. A máj alkohol dehidrogenáz (LADH) proton közvetítő rendszerén alapuló proton átmenetet vizsgálta különösképpen imidazol, szerin- és vízmolekulákat magába foglaló aktív hely modellen CNDO/2 számítások segítségével:



A szerző a cinkatom (töltés +0,5) által a fehérje környezet által létrehozott inhomogén elektromos tér és a nikotinamid dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) koenzim hatását tanulmányozta lépésről lépésre SCF reakció tér közelítésben. A vízmolekulára ható legnagyobb elektromos tér  $0,77 \times 10^{10}$  V/m volt. A cinkhez kötött vízmolekula savassága a kombinált terek következtében jelentősen megnőtt. A papain aktivitásával kapcsolatos nemempirikus kvantumkémiai vizsgálatokban a szerzők rámutattak arra [29, 35], hogy a fehérje  $\alpha$ -hélice egy kb.  $10^9$  V/m nagyságrendű elektromos teret képvisel. Az



enzimaktivitás fontos része a  $\text{RSH} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{RS}^- \dots \text{ImH}^+$  egyensúly; a ponttöltésekkel leírt hélix 60 kJ/mol energiával stabilizálja az ion-párt, és 32 kJ/móllal csökkenti az energia küszöböt. A teljes hélix tere helyett csak az aktív hely (Ala-160 és Asn-175) szomszédos régióit figyelembe vevő kiegészítő tanulmányban, mely azonban az enzim teljes térszerkezetét tekintetbe vette, arra a következtetésre jutottak, hogy a semleges rendszerhez képest az ion-pár 20–40 kJ/mol energiával stabilizálódott [28, 36]. A  $\text{Zn}^{2+}$  kation széndioxidra gyakorolt polarizáló hatása következtében a karbon anhidrázban könnyebbé válik a nukleofil megközelítése [37]. Mindezek a modell számítások meggyőzően alátámasztják azokat a korábbi elképzeléseket [38, 39], mi szerint a fehérjékben levő helyi elektromos tér globuláris (gömbalakú) fehérjék katalitikus tulajdonságait jelentősen befolyásolja.

Bizonyítékot találunk arra is, hogy az erős elektromos terek a bio-katalízis területén kívül más katalitikus folyamatokban is fontos szerepet játszanak. A zeolitok mikropórusaiban levő erős elektromos térrel magyarázzák például a szénhidrogén krakkoló aktivitást [40]. Itt, akárcsak az előbb említett enzimikus folyamatokban, a környezettől eredő elektromos mező következtében bekövetkező ion-pár stabilizálódásnak és proton savasság növekedésnek van döntő szerepe. Tanulmányozták továbbá a fémionoknak a hidrogénhidakra gyakorolt figyelemre méltó hatását [41–43]. Hozzá kell tennünk, hogy néhány különleges esetben a helyi mágneses tér befolyásolhatja a biológiai reakciók menetét, elsősorban gyökök, poligyökök pl. átmeneti fém komplexek esetében. Úgy tűnik azonban, hogy a mágneses tér hatása többnyire sokkal kisebb, mint az elektromos téré.

Bizonyítható, hogy számos biológiai folyamatban a helyi mezők játszanak döntő szerepet. Például a polién lánc abszorpciós sávjának helyét a rodopszinban a lánc közelében levő kation helye határozza meg [44].

Végezetül megemlítjük, hogy igen nagy kémiai rendszerek kezelésében jelentős haladás történt az utóbbi időben [45, 46], ez bizonyára elő fogja segíteni helyi elektromos terek helyes leírását.

### Összefoglalás

Az enzim-szubsztrát kölcsönhatások általánosan elfogadott modelljéből kiindulva a szerző öt témát tárgyal: 1. A van der Waals-erők részvétele és szerepe, 2. a van der Waals-kölcsönhatások megkülönböztető szerepe, 3. az entrópia és hő kapacitás jelentősége és szerepe, 4. enzimek és modelljeik reakció centrumai, valamint a tényleges kémiai átalakulás közös szerkezeti jellemzői, 5. erős elektromos terek hatása a kémiai átalakulásokra.

### Summary

Starting from an accepted model for enzyme-substrate interactions the following five items are discussed: 1. the participation and the role of van der Waals forces, 2. discriminative aspects of van der Waals interactions, 3. the significance and the role of entropy and heat capacity, 4. the common structural feature of the reaction sites of numerous enzymes and their models and the actual chemical transformation, 5. influence of strong local electric fields on the actual chemical transformation.



## IRODALOM

1. B. PULLMAN (Ed.), *Catalysis in Chemistry and Biochemistry, Theory and Experiment*, D. Reidel Publ. Comp., Dordrecht (1979).
2. W. P. JENCKS, *Advan. Enzymol.*, **43**, 219 (1975).
3. P. HOBZA, R. ZAHRADNÍK, *Weak Intermolecular Interactions in Chemistry and Biology*, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam (1980).
4. D. P. CRAIG, D. P. MELLOR, *Top. Curr. Chem.*, **63**, 1 (1976).
5. D. P. CRAIG, D. P. MELLOR, *Top. Curr. Chem.*, **63**, 1 (1976).
6. P. HOBZA, R. ZAHRADNÍK, H. WYNBERG, nem közölt eredmények, (1977).
7. P. HOBZA, R. ZAHRADNÍK, in preparation (1981).
8. M. I. PAGE, W. P. JENCKS, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1678 (1971).
9. P. HOBZA, R. ZAHRADNÍK, *Top. Curr. Chem.*, **93**, 53 (1980).
10. J. M. STURTEVANT, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2236 (1977).
11. J. A. MCCAMMON, M. KARPLUS, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 3585 (1979).
12. J. E. GREARY, Ref. 1, p. 11.
13. W. SIMON, *Advan. Chem. Phys.*, **39**, 287 (1978).
14. M. L. BENDER, M. KOMIYAMA, *Cyclodextrin Chemistry*, Vol. 6 of *Reactivity and Structure*, Springer-Verlag, Heidelberg (1977).
15. D. J. CRAM, J. M. CRAM, *Accounts Chem. Res.*, **11**, 8 (1978).
16. A. BRAIBANTI (Ed.), *Bioenergetics and Thermodynamics: Model Systems*, D. Reidel Publ. Comp., Dordrecht (1981).
17. G. L. TRAINOR, R. BRESLOW, *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 154 (1981).
18. M. EIGEN, G. G. HAMMES: *Advan. Enzymol.*, **25**, 1 (1963).
19. V. M. FAIN, *J. Chem. Phys.*, **65**, 1854 (1976).
20. J. PANCÍŘ, R. ZAHRADNÍK, *Helv. Chim. Acta*, **61**, 59 (1978).
21. J. O. NOELL, K. MOROKUMA, *J. Phys. Chem.*, **80**, 2675 (1976).
22. B. M. RODE, R. FUSSENEGGER, *Monatsh. Chem.*, **108**, 703 (1977).
23. B. M. RODE, G. J. REIBNEGGER: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. II*, **75**, 178 (1979).
24. J. SAUER, K. FIEDLER, W. SCHIRMER, R. ZAHRADNÍK, *Proc. of the Fifth Internat. Conf. on Zeolites* (L. C. V. Rees, Ed.), Heyden, London (1980).
25. O. TAPIA, *Quantum Theory of Chemical Reactions*, Vol. II, p. 25 (R. Daudel, A. Pullman, L. Salem, A. Veillard, Eds), D. Reidel Publ. Comp., Dordrecht (1980).
26. R. P. SHERIDAN, L. C. ALLEN, *Biophys. Chem.*, **11**, 133 (1980).
27. A. WARSHEL, M. LEVITT, *J. Mol. Biol.*, **103**, 227 (1976).
28. G. BOLIS, M. RAGAZZI, D. SALVADERI, D. R. FERRO, E. CLEMENTI, *Gazz. Chim. Ital.*, **108**, 425 (1978).
29. P. TH. VAN DUINEN, B. TH. THOLE, W. G. J. HOL, *Biophys. Chem.*, **9**, 273 (1979).
30. O. TAPIA, C. LAMBORELLE, G. JOHANNIN, *Chem. Phys. Lett.*, **72**, 334 (1980).
31. G. NÁRAY-SZABÓ, *Int. J. Quantum Chem.*, **61**, 265 (1979).
32. G. NÁRAY-SZABÓ, L. POLGÁR, *Int. J. Quantum Chem., QBS*, **7**, 397 (1980).
33. J. SERES, G. NÁRAY-SZABÓ, K. SIMON, K. DARÓCZI-CSUKA, I. SZILÁGYI, L. PÁRKÁNYI, *Tetrahedron* **37**, 1565 (1981).
34. F. H. JOHNSON, H. EYRING, M. J. POLISSAR, *The Kinetic Basis of Molecular Biology*, J. Wiley, New York (1954).
35. P. TH. VAN DUINEN, B. TH. THOLE, R. BROER, W. C. NIEUWPOORT, *Int. J. Quantum Chem.*, **17**, 651 (1980).
36. G. BOLIS, E. CLEMENTI, M. RAGAZZI, D. SALVADERI, D. R. FERRO, *Int. J. Quantum Chem.*, **14**, 815 (1978).
37. D. DEMOULIN, A. PULLMAN, *Catalysis in Chemistry and Biochemistry. Theory and Experiment* (B. Pullman, Ed.), p. 51, D. Reidel Publ. Comp., Dordrecht (1979) (and papers cited therein).
38. G. JOHANNIN, N. KELLERSHON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 321 (1972).
39. D. M. HAYES, P. KOLLMAN, *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 7811 (1976).
40. H. W. HAYNES, JR., *Catal. Rev. Sci. Eng.*, **17**, 273 (1978).
41. I. ČERNUŠÁK, M. URBAN, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **43**, 1956 (1978).
42. B. M. RODE, *Theoret. Chim. Acta (Berl.)* **56**, 245 (1980).
43. P. HOBZA, H.-J. HOFMANN, nem közölt eredmények (1981).
44. B. HONIG, U. DINUR *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 7084 (1979).
45. E. CLEMENTI, *Lecture Notes in Chemistry*, Vol. 19, Springer Verlag, Berlin (1980).
46. A közlemények egy sorozatát közölték: Vol. 367 of *Ann. New York Acad. Sci.* (1981).

# AZ ENZIMHATÁS MECHANIZMUSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA KINETIKUS NMR VIZSGÁLATTAL

JÁNOS RÉTEY

(Lehrstuhl für Biochemie der Universität Karlsruhe, NSZK)

## Bevezetés

A kémiai reakciók mechanizmusának két fő kísérleti megközelítési módja a sztereokémiai és kinetikai vizsgálat. A reakció sztérikus lefutásának meghatározása az átmeneti állapot geometriájáról ad információt, míg a kinetikai mérésekből az átmeneti állapot energiájára vonatkozóan vonhatunk le következtetéseket. Az enzimatis reakciók sztereospecifitása nagyon gyakran rejtett, azaz nem szembetűnő izotópos jelzés nélkül. A klasszikus vizsgálatokban ezért nehéz izotópokat, mint pl.  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{17}\text{O}$  vagy  $^{18}\text{O}$  alkalmaztak és azokat az izolált termékekben tömegspektroszkópiái, rádióaktivitási vagy NMR spektroszkópiái mérésekkel mutatták ki. Az izotópok sztereokémiai pozícióját további kémiai vagy enzimatis átalakításokkal vagy a deutérium esetében kiroptikai mérések segítségével kellett meghatározni olyan összehasonlító vegyületet alkalmazva referensként, amelynek az abszolút konfigurációja ismert volt.

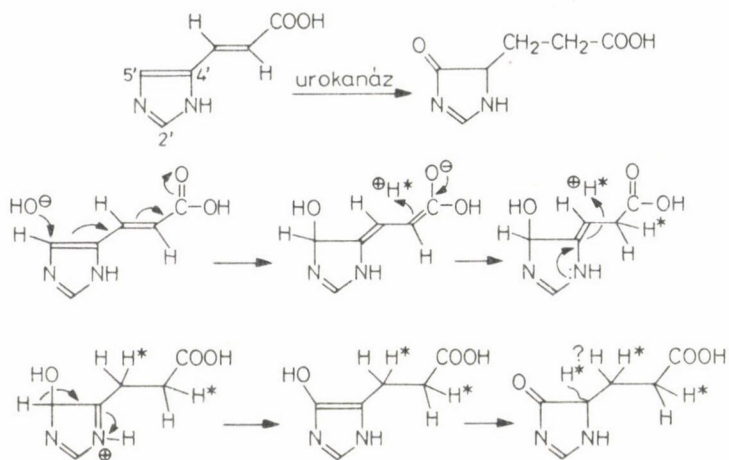
Az enzim kinetika tanulmányozására az UV/VIS spektroszkópia a legjobb választás, mivel gyors, egyszerű és ami a leglényegesebb, érzékenysége lehetővé teszi nagyon híg oldatok vizsgálatát, amelyeket az enzimek körében végzett vizsgálatok megkövetelnek.

Az NMR technológia újabb fejlődése lehetővé tette az enzimatis reakciók követését közvetlenül az NMR csőben. A 200—500 MHz-es frekvenciáknak és a Fourier transzformációs módszernek a segítségével 1 mM-os oldatok spektrumát 1—2 percen belül megkaphatjuk. A választott oldószer káliumfoszfát puffer deutériumoxidban, de bizonyos mennyiségű deuterált szerves oldószert is, mint pl. deuterometanolt és deuterioetanolt is hozzáadhatunk, ha szükséges.

Itt szeretnék beszámolni két enzimatis reakció NMR kinetikai vizsgálatairól, melyeket urokanáz és koenzim- $\text{B}_{12}$ -dependens metilmalonil-CoA mutáz katalizálnak. Mindkét reakciónak szokatlan mechanizmusa van, ami felkeltette érdeklődésünket.

## Az urokanáz reakció

Az urokanáz a hisztidin lebomlásának második lépését katalizálja (1. ábra). A reakció tulajdonképpen víz addíciója urokánsavra, és úgy lehet tekinteni, mint egy 1,4-addíciót egy aktivált dién rendszerre, melyet néhány tautomerizációs lépés követ. Végeredményben az imidazol gyűrű oxidálódik, míg az oldallánc kettős kötése redukálódik. A mechanizmus gyenge pontja az, hogy elektronban gazdag imidazolgyűrűn a nukleofil támadás nehezen megy végbe.

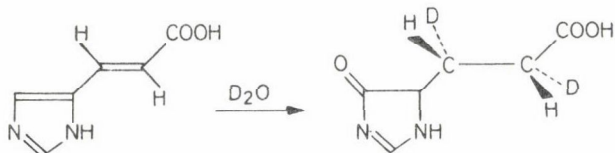
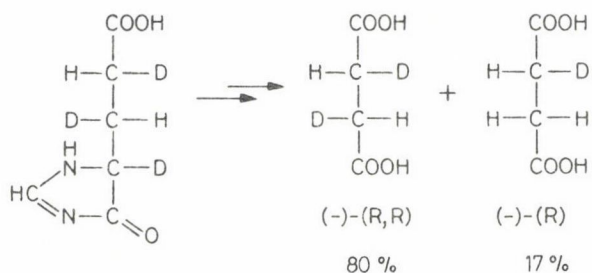


1. ábra. Az urokanáz reakció. Hipotetikus mechanizmus séma, figyelmen kívül hagyva az enzim szerepét

Első kísérletünkben el akartuk dönteni a termékben a protonok eredetét (2. ábra [1]). Ha az urokanáz reakciót deutériumoxidban hajtottuk végre és a terméket oxidatív lebontással borostyánkőssavvá alakítottuk, az optikai rotációs diszperziós és tömegspektrometriás vizsgálatok az oldószerből származó deutérium atomok sztereospecifikus beépülését igazolták az oldalláncba. A szubsztrát 5-ös helyzetéből nem történt hidrogénátvitel a termékbe. NMR vizsgálatok azt mutatták, hogy az imidazol-propionát 4-H atomja is az oldószerből származik. A 60-as évek óta ismert, hogy az urokanáznak vagy egy prosztetikus csoportja, mely nukleofil reagensekkel támadható, mint pl. hidroxilaminnal, szemikarbaziddal vagy nátriumtetrahydroboráttal. Ha tríciummal jelzett nátriumtetrahydroborátot használtak, trícium épült be a fehérjébe, amit enzimaktivitás csökkenés kísért [2].

Egy tévedésekkel terhes időszak után EGAN és PHILIPS a Penn State University-n [3], és csoportunk [4] egyértelműen igazoltuk, hogy az urokanáz prosztetikus csoportja szorosan kötött  $\text{NAD}^+$ . A  $\text{NAD}^+$  szerepe a katalitikus folyamatban még nem világos. Másrésről további mechanizmus részleteket tisztáztunk kinetikus NMR mérésekkel [5, 6]. Néhány mg urokánsavat oldottunk deuterált foszfátpufferben és a

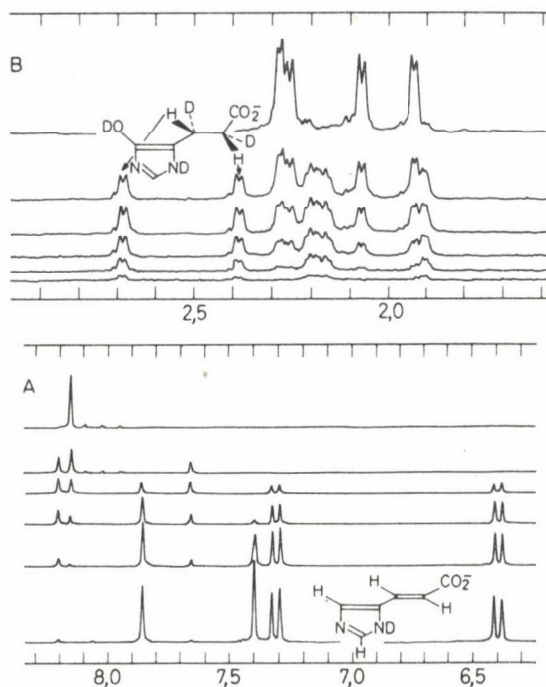




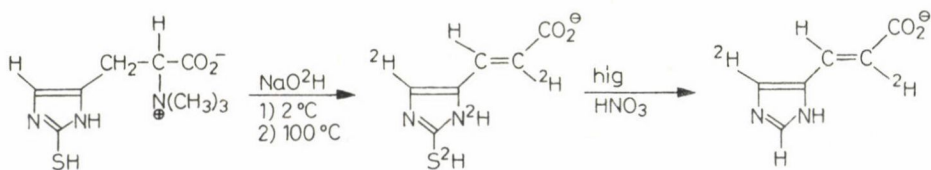
2. ábra. Az oldószerből származó deutérium sztereospecifikus beépülése az urokanáz termékbe, amint az a lebontással nyert deuterált borostyánkősav szerkezetén látható

reakciót urokanázzal indítottuk el közvetlenül az NMR csőben. A spektrumokat, bizonyos időközökben felvettük. Néhány perccel a start után lényegében az urokanáz spektrumát (3A ábra), az olefin protonok AB rendszerét és az imidazol gyűrű két protonjának szingulettjeit kaptuk. Már a második spektrumban két átmeneti szingulett jelentkezik. Mintegy hat óra után csak egy szingulett jelentkezik az aromás tartományban, amit először az imidazolon propionáthoz rendeltünk. Jelentős az a tény, hogy az 5-ös proton gyorsabban tűnik el, mint az AB rendszer, ez annak a következménye, hogy az urokanáz elősegíti ennek a protonnak az oldószer deutérium atomjaira történő cseréjét. Egy hasonló, bár valamivel lassúbb csere figyelhető meg a kompetitív inhibitorral, imidazol propionáttal, jelezve, hogy az oldallánc kettőskötése nem vesz részt a reakció első lépésében. A spektrumok az alifás tartományban, hasonlóan felvéve, információt szolgáltatnak a végtermék és az átmeneti termékek szerkezetéről (3B ábra). A két dublett 2,7 és 2,4 ppm-nél az imidazolon propionsav enol formájához rendelhető. A végtermék négy dublettet mutat. Mivel ezek egy  $\alpha$  és egy  $\beta$  protonhoz tartoznak és mivel a deutérium addíció az oldalláncra sztereospecifikus, a végterméknek aszimmetrikus centrummal kell rendelkeznie és racémát formában létezik. Ez összhangban levőnek tűnik a racém imidazolon propionát szerkezetével. A korábbi spektrumokban más intermedier jelei is jelentkeznek, mellyel még később fogunk foglalkozni.

Amikor a kinetikai méréseket 8 °C-on végeztük, a végtermék jelei rendkívül lassan jelentek meg. Mivel ismeretes volt, hogy az imidazolon-propionát nem enzimatisz uton *N*-formilizoglutaminná hidrolizál [7], izoláltuk a végterméket és megvizsgáltuk az UV spektrumát. Mivel 200 nm felett abszorpció nem volt és további NMR vizsgálatok is azt jelezték, hogy valóban *N*-formilizoglutaminnal van dolgunk.



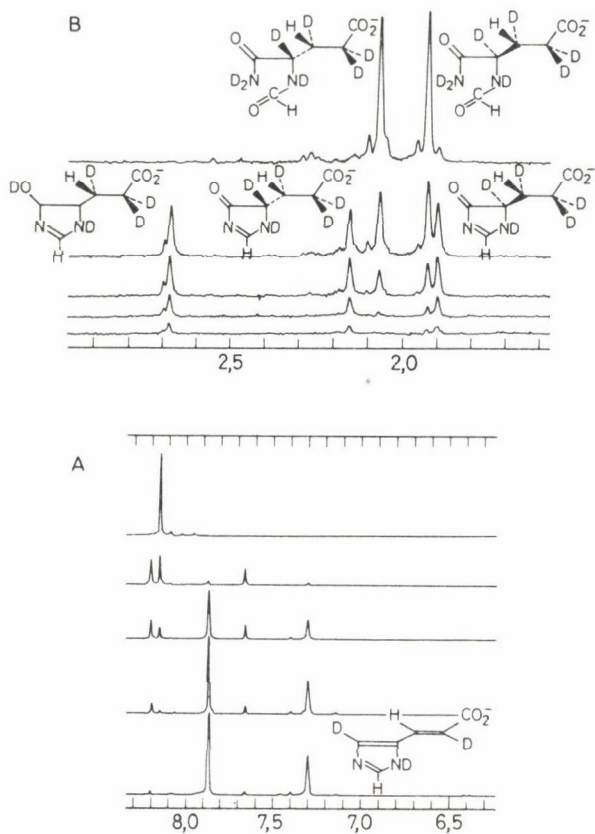
3. ábra. Az urokanáz reakció kinetikája deutériumoxidban  $^1\text{H}$ -NMR spektroszkópiával követve 500 MHz-en. Az ábrák alulról felfelé a 4, 26, 55, 79, 103 és 363 perccel a reakció kezdete után felvett spektrumok láthatók. „A” rész aromás tartomány; „B” rész alifás tartomány



4. ábra. Az ( $\alpha$ - $^2\text{H}_1$ , 5- $^2\text{H}_1$ ) urokánsav előállítása

További bizonyítékot szolgáltatott az átmeneti termék szerkezetére egy specifikusan deuterált urokanát minta kinetikus NMR vizsgálata. A kívánt mintát a kereskedelem-ben hozzáférhető ergotioneinből állítottuk elő, amit először  $2\text{ }^\circ\text{C}$ -on NaOD-vel reagáltattunk, amikor két proton cserélődött le, majd  $100\text{ }^\circ\text{C}$ -on trimetilamin eliminációt hajtottunk végre (4. ábra). A tiol csoportot végül salétromsavas kezeléssel távolítottuk el.

Amint ennek az urokanát minta spektrumának a kis terek felé eső tartományán látszik (5A. ábra), a deutérium az  $\alpha$  és 5-ös pozícióban található. Tisztább kép alakult ki

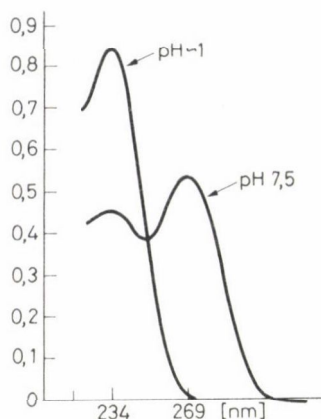


5. ábra. Az ( $\alpha$ - $^2\text{H}_1$ ,  $5$ - $^2\text{H}_1$ ) urokanát urokanáz reakciójának kinetikája deutériumoxidban  $^1\text{H}$ -NMR spektroszkópiával követve 500 MHz-en. Alulról fölfelé a 9, 22, 54, 94 és 420 perccel a reakció kezdete után felvett spektrumok láthatók. „A” rész aromás tartomány; „B” rész alifás tartomány

a spektrum nagy tartományában (5B. ábra). Itt láthatjuk az 5-hidroxi-imidazol propionát  $\beta$ -protonjának szingulettjét és az utolsó spektrumban az enantiomer *N*-formilizoglutamin  $\beta$ -protonjainak megfelelő két szingulettet. Sőt, egy második intermedierek két szingulettje is jelentkezik, amelynek szintén aszimmetriás centrummal kell rendelkeznie és mint racemát keletkezik. Azt, hogy ez azonos az imidazol propionáttal, UV mérések is igazolták (6. ábra). Az imidazolon propionát ( $\lambda_{\text{max}}$  269 nm) pH 7,5-nél egyensúlyban van az enol formával ( $\lambda_{\text{max}}$  234 nm), míg pH 1-nél csak az enol forma létezik, ami hidrolízissel szemben stabilis.

Ami a  $\text{NAD}^+$  szerepét illeti a katalízisben, két alternatíva lehetséges. A  $\text{NAD}^+$  működhet, mint egy átmeneti hidrid átvivő a szokásos módon. Sajnos a hidrogén transzfer hiánya az 5-ös pozícióból a termék akármelyik pozíciójába, a hidrid transzferre nézve sem nem bizonyíték, sem nem ellenbizonyíték. A másik lehetőség az imidazol nukleofil addíciója lenne a  $\text{NAD}^+$ -ra, amire van kémiai analógia.





6. ábra. Az urokanáz termékek, imidazolon propionát/5-hidroxiimidazol propionát UV spektruma pH ~1-nél és pH 7,5-nél

### A metilmalonil-CoA-mutáz reakció

Előadásom második részében a koenzim  $B_{12}$ (AdoCbl)-dependens metilmalonil-CoA-mutáz reakció néhány mechanisztikus jellemzőiről fogok beszámolni.

Mint a 7. ábra mutatja, számos átrendeződés ismeretes, melyet a  $B_{12}$  koenzim katalizál és összhangban van a következő általános sémával. A metilmalonil-CoA mutáz reakcióban egy COSCoA csoport vándorol a szomszédos szénatomra az egyik metil hidrogénatom ellenkező irányban történő vándorlásával egyidejűleg. A COSCoA csoport vándorlása intramolekuláris folyamatnak bizonyult [8, 9] és jó okunk van kiterjeszteni ezt a megfigyelést az R csoport vándorlására más átrendeződések esetén is.

Overath és munkatársai [10] a reakciót tríciummal jelzett vízben végezték racemázmentes mutáz készítménnyel (a racemáz vagy epimeráz olyan enzim, amely a metilmalonil-CoA enolizációját katalizálja) és azt találták, hogy legfeljebb csak nagyon kismértékű trícium beépülés történik a képződött szukcinil-CoA-ba. Ez az eredmény egy intramolekuláris hidrid vándorlást látszott alátámasztani az átrendeződés folyamán.

A hidrogénvándorlást Frey és Abeles 1966-ban revideálta [11] azt találva, hogy a triciált szubsztrátból kiindulva a trícium a koenzim  $B_{12}$ -ben a kobalthoz kötődő metilén csoportba épül be. A 8. ábrán a komplementer kísérletet mutatjuk be, ahol trícium átmenet játszódik le a kobalthoz kötött metilén csoportból a termékbe.

Ezt követően kimutatták, hogy [12] a trícium átmenet kinetikailag jelentős és összhangban van azzal az elképzeléssel, hogy a szubsztrát és a koenzim közötti kölcsönös hidrogén átmenet szükséges lépése az átrendeződésnek. Bizonyítékot találtak a koenzim hasonló szerepére a metilmalonil-CoA mutáz reakcióban [13, 14]



$R = \text{COSCoA}$ ,  $R' = \text{CO}_2\text{H}$ ,  $R'' = \text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ ; metilmalonil CoA mutáz

$\text{NH}_2$   
|  
 $R = \text{CHCO}_2\text{H}$ ,  $R' = \text{CO}_2\text{H}$ ,  $R'' = \text{H}$ ; glutamát mutáz

$\text{CH}_2$   
||  
 $R = \text{CCO}_2\text{H}$ ,  $R' = \text{CO}_2\text{H}$ ,  $R'' = \text{H}$ ; 2-metilén glutarát mutáz

$R = R' = \text{OH}$ ,  $R'' = \text{CH}_3$ ,  $\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ; diol dehidráz

$R = \text{NH}_2$ ,  $R' = \text{OH}$ ,  $R'' = \text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ ; etanolamin ammónia liáz

$\text{NH}_2$   
|  
 $R = \text{NH}_2$ ,  $R' = \text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ,  $R'' = \text{H}$ ;  $\beta$ -lizin mutáz

7. ábra. Metilmalonil CoA mutáz, glutamát mutáz, 2-metilén-glutarát mutáz, diol dehidráz, etanolamin ammónia liáz,  $\beta$ -lizin mutáz. A koenzim  $\text{B}_{12}$ -dependens átrendeződés vicinális kicserélődési reakciója



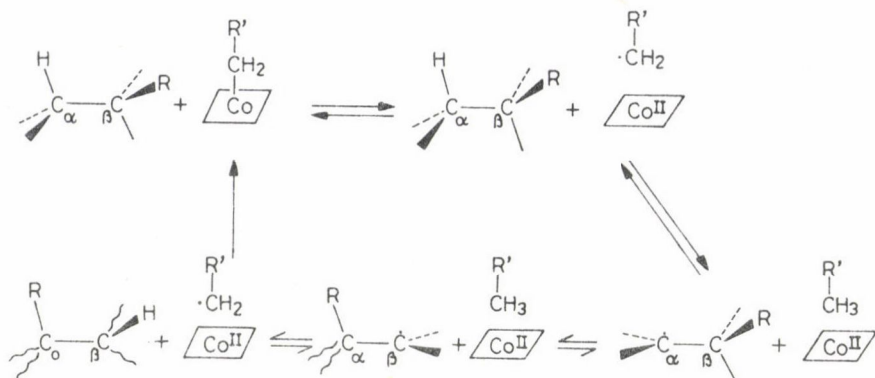
Frey és Abeles, 1966

8. ábra. A  $\text{B}_{12}$  koenzimből a termékbe történő trícium átmenet a propándiol dehidratáz reakcióban

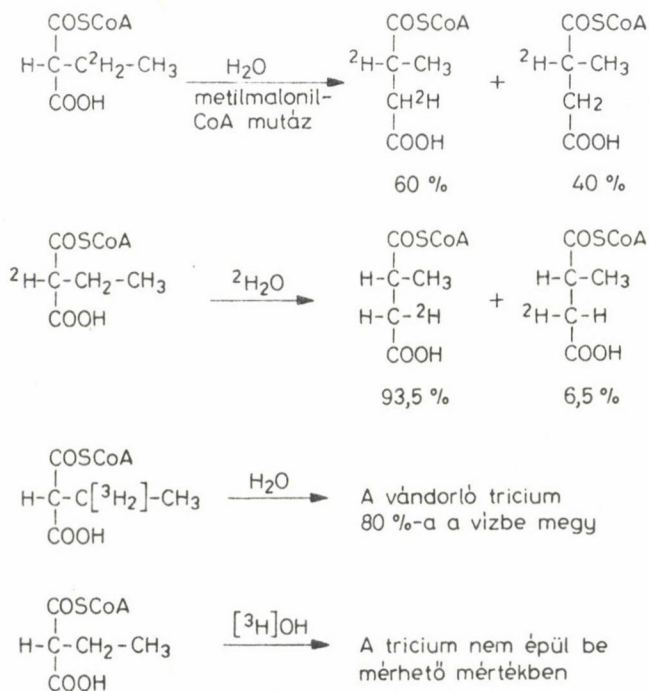
és tulajdonképpen az összes eddig vizsgált más átrendeződésben [15, 16]. Ezek és más eredmények alapján a koenzim- $\text{B}_{12}$  katalizálta reakciók hipotetikus mechanizmusa született meg, melyet a 9. ábrán mutatunk be. A reakció kezdőlépése a kobalt—szén kötés homolízise, melyet egy hidrogéngyök átmenet követ a szubsztrátból a módosított koenzimre.

Az R csoport vándorlása még egy „fekete-doboz” folyamat, de valószínűleg a központi kobalt atom katalizálja. Az utolsó lépésben a termékgyök egy hidrogéngyököt von el a módosított koenzimből létrehozva a terméket és az intakt koenzimet.

Újabb eredményeink azt mutatják, hogy a hidrogén vándorlás sokkal bonyolultabb folyamat, mint azt ebben a sémában feltételeztük. Az első problémát a specifikusan deuterált etilmalonil-CoA szubsztrát analóggént való alkalmazása jelentette, metilmalonil-CoA helyett [17]. Az etilmalonil-CoA átalakítása metilszukcinnil-CoA-vá P. shermanii-ből származó metilmalonil-CoA mutáz segítségével



9. ábra. A koenzim B<sub>12</sub> dependens átrendeződések széles körben elfogadott mechanizmusa

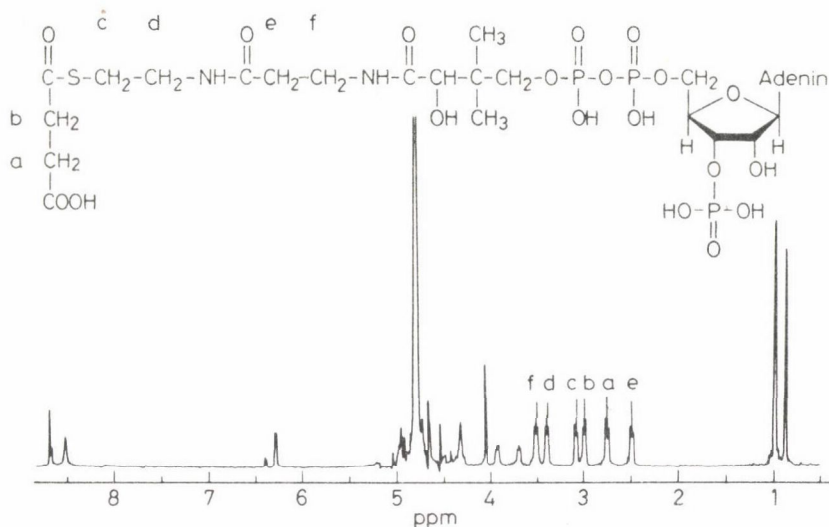


10. ábra. Metilmalonil CoA mutáz; 80% vándorló trícium vesztes a vízben; trícium beépülés nem mérhető a termékben. A vándorló hidrogénatom sorsának vizsgálata izotópos (<sup>2</sup>H és <sup>3</sup>H) jelzéssel a metilmalonil-CoA mutáz reakcióban

körülbelül ezerszer lassabban megy végbe, mint a természetes szubsztrát esetében. Ha a metilén csoportban tökéletesen deuterált etilmalonil-CoA-t reagáltattunk, a vándorló deutérium az esetek 36–40%-ában elveszett (10. ábra). Ugyanilyen vesztséget figyeltünk meg a sztereospecifikus deuterált és az etil csoportban teljesen deuterált etilmalonil-



CoA speciesz esetén is. Ha a jelzés módját felcseréljük, azaz az oldószer deutériumoxid volt, tömegspektrometriásan csak monodeuterált terméket lehetett kimutatni. Továbbá, NMR vizsgálatok alapján az esetek 94%-ában eritro pozícióban történt a deuterálódás, míg csak 6% deutérium volt kimutatható a korábban a vándorló hidrogén kötőhelyeként azonosított treo pozícióban.

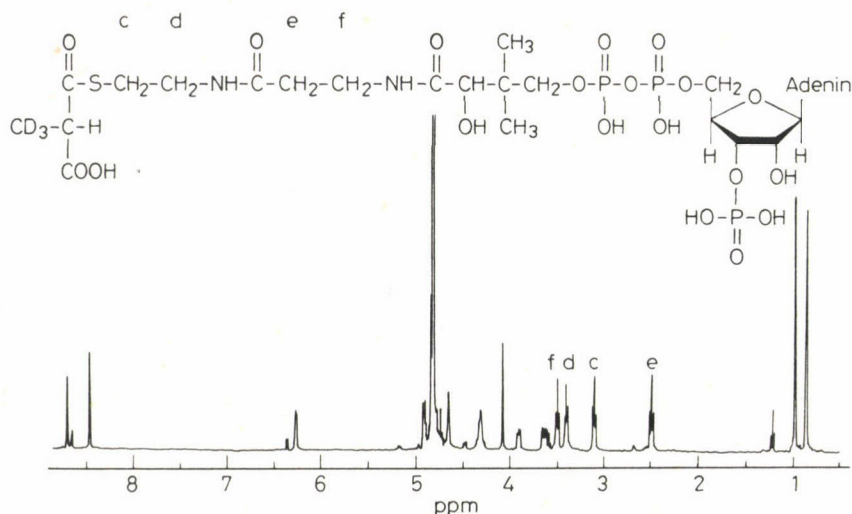


11. ábra. A (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>) metilmalonil-CoA 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spektruma deutériumoxidban (p<sup>2</sup>H ~ 1). A kénhez kötődő metilén csoport triplettje 3,11 ppm-nél jelentkezik.

Mivel a tömegspektrometria hibahatára kb. 2% volt, megállapíthatjuk, hogy kevesebb mint 2% procium (hidrogén) cserélődött az oldószerből származó deutériummal. Két későbbi kísérlet trícium jelzéssel lehetővé tette, hogy a migráló hidrogén izotóp sorsát követhessük. Itt azt találtuk, hogy a vándorló trícium 80%-a elveszik a vízben, míg legfeljebb nagyon kismértékű trícium beépülés történik a közegből a komplementer kísérletben. Számbavéve a mérések hibahatárát az eredmények csak úgy magyarázhatók, hogy a látszólagos deutérium izotóp effektus 20-nál nagyobb, míg a trícium izotóp effektusa nagyobb 80-nál.

Abból a célból, hogy eldönthessük vajon a vándorló nehézionotóp veszteség csak a nem természetes etilmalonil-CoA-ra korlátozódik vagy a normál metilmalonil-CoA szubsztrátnál is előfordul, az utóbbit előállítottuk teljesen deuterált metil csoporttal. Az NMR spektrum a deutérium tartalmat igazolta (11. ábra). Továbbá a CoA rész metilénecsoportjainak különálló triplettjei is megfigyelhetők és ez a triplett a kénatomhoz kapcsolódó metilénhez rendelhető. Célunkhoz jelentős tudni, hogy ez a jel valamennyire a nagyobb térerők felé tolódik el a szukcinil-CoA-ban és ez a tény kihasználható az elegyben a két acil-CoA arányának meghatározására.

A nem jelzett szukcinil-CoA spektruma a 12. ábrán látható, melyben megtalálhatók a CoA rész metilén triplettjei, továbbá a szukcinil rész két triplettje. Az összes tripletteket úgy asszignáltuk, ahogy jelezve van. Ezek ismeretében a következő kísérletet végeztük el: teljesen deuterált metilcsoportot tartalmazó metilmalonil-CoA-t normál vízben reagáltattuk, kismennyiségű metilmalonil-CoA mutázzal, majd a



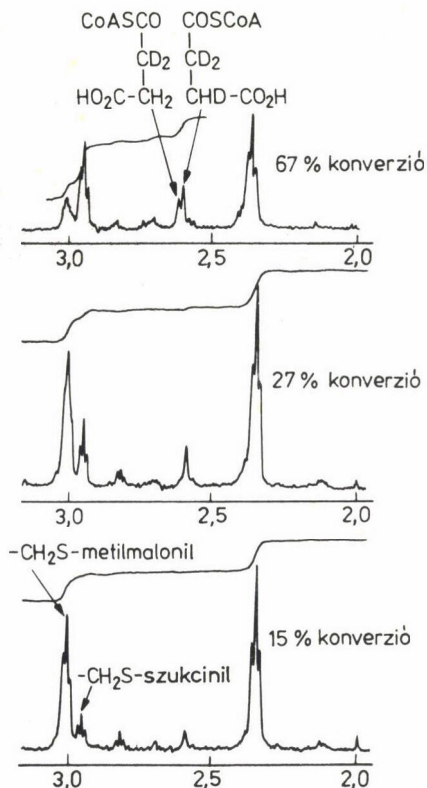
12. ábra. Jelzetlen szukcinil-CoA 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spektruma deutériumoxidban ( $p^2H \sim 1$ ) kénhez kapcsolódó metilén triplettje 3,07 ppm-nél jelentkezik

reakciót néhány perc múlva megállítottuk perklórsav hozzáadásával. Ioncserés tisztítás után a terméket liofilizáltuk, D<sub>2</sub>O-ban oldottuk és 500 MHz-es <sup>1</sup>H-NMR spektrumát megvizsgáltuk. Az átalakulást a két kénatomhoz tartozó metilén csoportok triplettjeinek integrálásával határoztuk meg (13. ábra). 15% konverzióánál egy procium szingulettjét figyelhetjük meg, amely a szukcinát szabad karboxilcsoportja melletti metilénen van. 27% konverzióánál már egy váll jelenik meg és 67% konverzióánál, azaz sokkal az egyensúly beállta előtt egy második szingulett jelenik meg, ami a szukcinil-CoA jelzetlen metilén csoportjához rendelhető.

Az integrálás azt mutatta, hogy ennél a stádiumnál a migráló deutériumnak már 21%-a prociumra cserélődött, mivel az utolsó kísérletben a reakció csak 6 percig futott, valószínűleg, hogy valami „tévedés” történt volna.

Végül egy kísérletsorozatot mutatunk be, amelyben az 5' pozícióban sztereospecifikusan deuterált koenzim B<sub>12</sub> mintákat használtunk. Gaudemer professzorral (Université d'Orsay) [18, 19] együttműködve, adenzilkobalaminokat állítottunk elő, vagy 5'-toziladenozinon vagy 5'-klóradenozinon keresztül. (5'R)-(5'-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>) adeno-

zínből kiindulva tehát úgy ( $5'R$ ), mint ( $5'S$ )—( $5'^2H_1$ ) adenzozilkobalaminok előállítását egy vagy két konfiguráció inverzióval járó eljárással. ( $5'R$ )—( $5'^2H_1$ ) adenzozint és ( $5'S$ )—( $5'^2H_1$ ) adenzozilkobalaminat egymástól függetlenül előállította Parry és Abeles [20, 21].

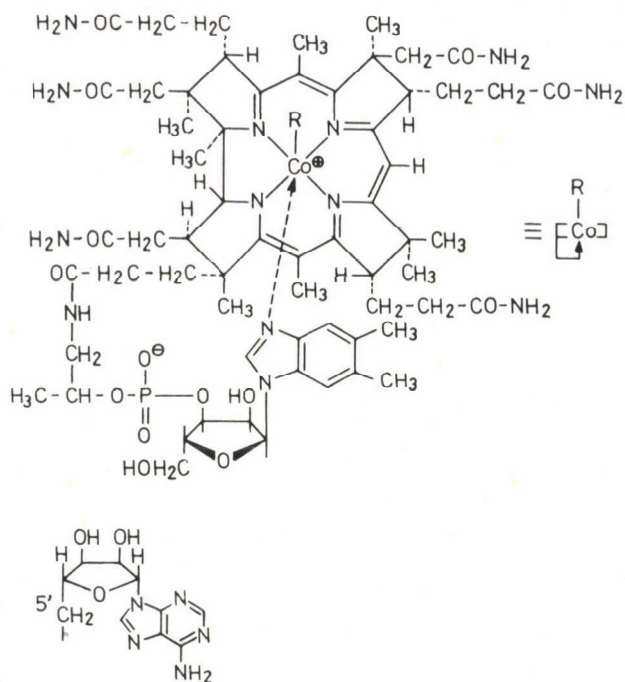


13. ábra. 67% konverzió; 27% konverzió; 15% konverzió;  $\text{CH}_2\text{S}$ -metilmalonil;  $\text{CH}_2\text{S}$ -szukcinil; ( $^2H_3$ )-metilmalonil-CoA enzim-katalizálta átrendeződésének követése. A fenti átalakulások reakcióideje 1 és 6 perc között van

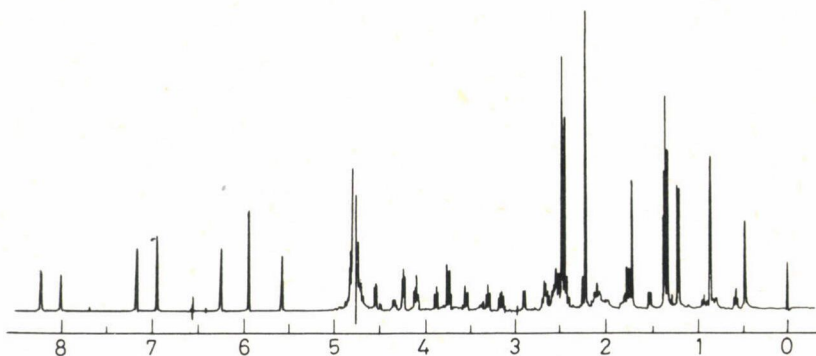
Ezek után célszerű megnézni a koenzim  $B_{12}$  szerkezetét (14. ábra) azért, hogy mely hidrogénatomok voltak jelezve.

A 15. ábrán látható a jelzetlen adenzozilkobalamin 500 MHz  $^1H$ -NMR spektruma deutériumoxidban. Ellentétben a lerajzolt szerkezettel, biztosak lehetünk abban, hogy az NMR spektrumban mind a tizenegy metil csoportot megtaláljuk. Szempontunkból még jelentősebb a 0,6 ppm-nél jelentkező triplett és a 1,5 ppm-nél látható dublett, amelyek a kobalt atomhoz kapcsolódó metilén diasztereotóp protonjaihoz tartoznak. A 16. ábrán a spektrum magas télerő tartományát széthúzva mutatjuk be. A két releváns jel integrálása elég pontos ahhoz, hogy  $^1H$ -NMR technikát



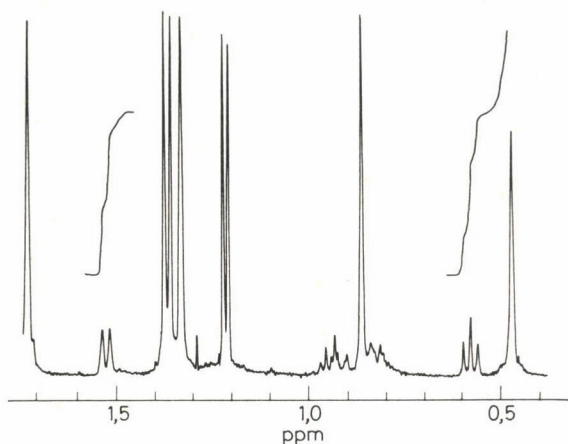


14. ábra. A koenzim B<sub>12</sub> szerkezete (AdoCbl)

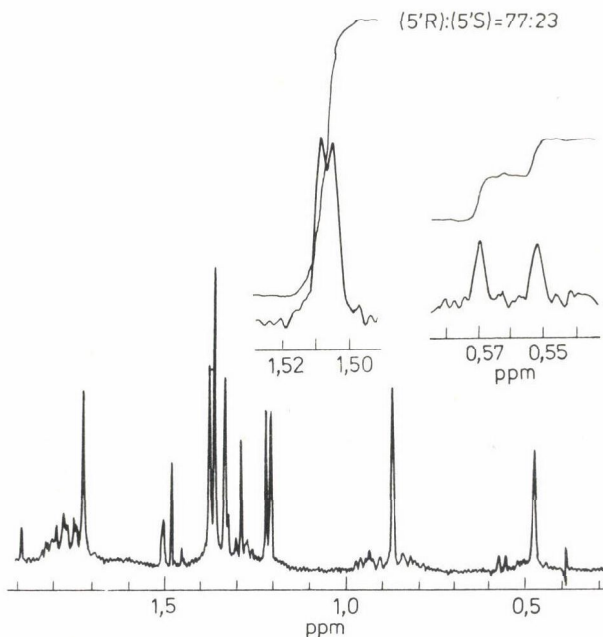


15. ábra. A koenzim B<sub>12</sub> 500 MHz <sup>1</sup>H-NMR spektruma deutériumoxidban. (Az Eur. J. Biochem. engedélyével [19])

alkalmazunk a deutérium kvantitatív meghatározására ezekben a pozíciókban. Ezt a 17. ábrán mutatjuk be az (5'R)-(5'-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>) AdoCbl spektrumán. Sajnos, a minta sztereokémiai tisztasága nem 100%-os. Ennek két oka van: 1. a kiindulási 5'-deuteroadenozinnak a sztereokémiai tisztasága csak 85% volt, 2. a kobalaminnal (I)



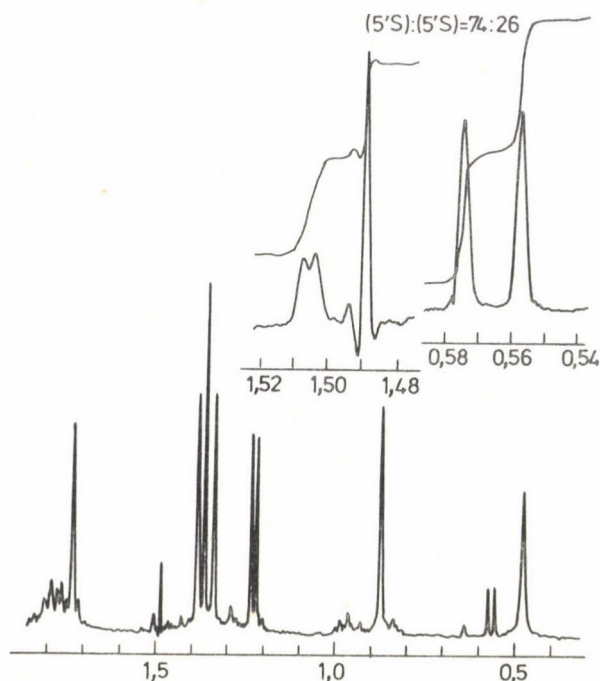
16. ábra. A koenzim  $B_{12}$   $^1H$ -NMR spektrumának magasterű részlete (az Eur. J. Biochem. engedélyével [19])



17. ábra. Az  $(5'R)-(5'-^2H_1)$  koenzim  $B_{12}$   $^1H$ -NMR spektrumának magasterű részlete. Az  $(5'R):(5'S)$  arány 77:23, (az Eur. J. Biochem. engedélyével [19])

( $B_{12S}$  vitamin) történő szubsztitúció nem tökéletesen sztereospecifikus. Például deuterio etiltoziláttal 83% inverziót és 17% retenciót figyeltünk meg [22]. Hasonló sztereokémiai tisztaságot értünk el az  $(5'S)-(5'-^2H_1)$  AdoCbl-nal, melynek NMR spektrumát a 18. ábrán mutatjuk be.

Ezeket a sztereospecifikusan deuterált AdoCbl mintákat *P. shermanii*-ből származó metilmalonil-CoA-val inkubáltattuk. Az inkubáció 36 órát tartott és a koenzim 10:1 arányú feleslegben volt az enzimhez képest. Ha egy enzim indukálta homolitikus hasadás valóban előfordulna, a deutérium megoszlását várnánk a két

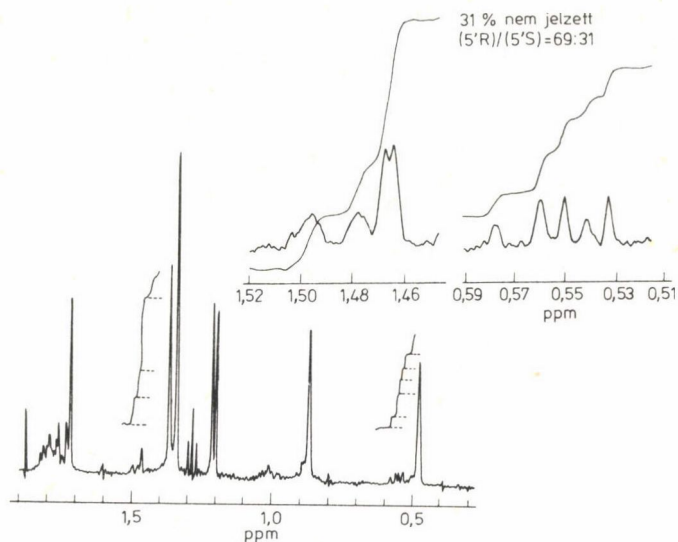


18. ábra. Az  $(5'-S)-(5'-^2H_1)$  koenzim  $B_{12}$   $^1H$ -NMR spektrumának magasterü részlete. Az  $(5'S):(5'R)$  arány 74:26. (Az Eur. J. Biochem. engedélyével [19])

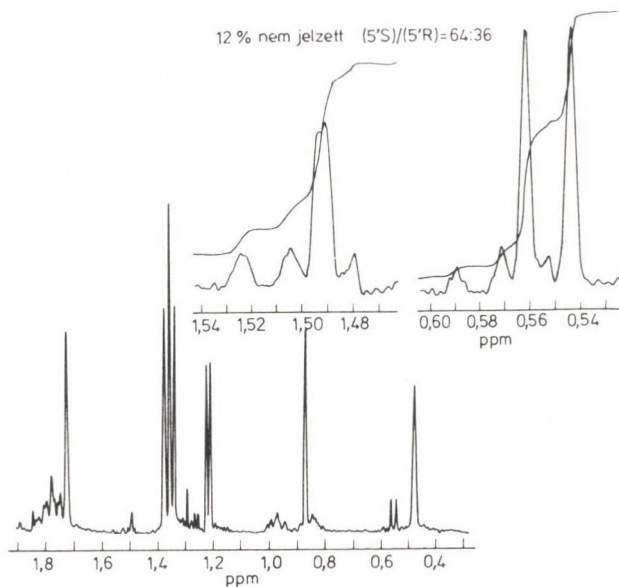
diasztereotóp pozíció között. Ennél több történt (19. ábra). Az  $(5'R)$ -koenzimes inkubáció után az ismét izolált anyag 31%-a jelzetlen molekula volt, míg az  $(5'R):(5'S)$  arány 77:23-ról 69:31-re csökkent. Figyelemre méltó, hogy 500 MHz-en a felbontás lehetővé tette, hogy külön-külön integráljuk a jelzetlen és a két monodeuterált specieszt. A kiegészítő kísérletben (20. ábra)  $(5'S)$ -deuterált koenzim esetén csak 12% jelzetlen anyag képződött az inkubáció során és az  $(5'S):(5'R)$  arány 74:26-ról 64:36-ra csökkent.

Ezekből az eredményekből a következőkre következtethetünk: i) az enzimhez kötött és a szabad AdoCbl molekulák gyakran cserélnek helyet az inkubáció alatt, ii) a deutérium az AdoCbl  $5'$  pozíciójából az oldószerbe távozik és iii) a deutérium szóródása valóban előfordult a két diasztereotóp  $5'$  pozíció között. Ezért a szóródásért torziószimmetrikus intermedierek, mint pl. metilénygök vagy metilcsoport a felelős. Bármelyik intermedier magával vonja a kobalt—szén kötés hasadását.





19. ábra. 31% jelzetlen; Az (5'R)–(5'- $^2\text{H}_1$ ) koenzim  $\text{B}_{12}$   $^1\text{H}$ -NMR spektrumának magasterű részlete P. shermanii-ből származó metilmalonil-CoA mutázzal történt inkubáció után. A jelek integrálása 31% jelzetlen molekulát mutat és 69:31 (5'R):(5'S) arányt a monodeuterált molekuláknál. (Az Eur. J. Biochem. engedélyével [19])



20. ábra. 12% jelzetlen; Az (5'S)–(5'- $^2\text{H}_1$ ) koenzim  $\text{B}_{12}$   $^1\text{H}$ -NMR spektrumának magasterű részlete P. shermanii-ből származó metilmalonil-CoA mutázzal történt inkubáció után. A jelek integrálása 12% jelzetlen molekulát mutat és 64:36 (5'S):(5'R) arányt a monodeuterált molekuláknál. (Az Eur. J. Biochem. engedélyével [19])

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁSOK

A Karlsruhe-i laboratóriumban végzett munkát azok a fiatalabb kollégáim végezték, kiknek neveit az irodalomjegyzékben találhatjuk. Az ő lelkesedésük és ügyességük tette lehetővé előadásom megtartását. Köszönetemet fejezem ki Alain Gaudemer professzornak, Université Paris-Sud, Orsay, az együttműködéséért sztereospecifikusan deuterált koenzim  $B_{12}$  minták vizsgálatában és dr. W. E. HULL, Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, az 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR mérésekért. Hálámat fejezem ki a Deutsche Forschungsgemeinschaftnak és a Fonds der Chemischen Industrie-nak a bőkezű anyagi támogatásért.

## Összefoglalás

Az urokanát enzimátikus konverzióját  $^1\text{H}$ -NMR spektroszkópiával követtük 500 MHz-en deutériumoxidban. Azt találtuk, hogy a) az urokanáz jobban gyorsítja a szubsztrát 5-ös hidrogénjének a cseréjét, mint az egész reakciót, b) a termék racém  $\beta$ -(5-oxoimidazol-4-il) propionát és a  $\beta$ -(5-hidroxiimidazol-4-il) propionát egyensúlyi elegye, c) a  $\beta$ -(5-oxoimidazol-4-il) propionát spontán hidrolizál fiziológiai körülmények között *N*-formil-izoglutaminná. Ez a hidrolízis jelentősen lelassul  $8^\circ\text{C}$ -on. UV és  $^1\text{H}$ -NMR spektroszkópia azt mutatja, hogy a  $\beta$ -(5-hidroxiimidazol-4-il)propionát ( $\lambda_{\max}$  234 nm), alacsony pH-n (pH 1) protonált formában létezik, míg semleges pH-n (7,5) egyensúlyban van a  $\beta$ -(5-oxoimidazol-4-il)propionáttal ( $\lambda_{\max}$  269 nm).

A koenzim- $B_{12}$ -dependens metilmalonil-CoA mutáz reakciójában a hidrogén átmenetet deutérium és trícium jelzéssel és  $^1\text{H}$ -NMR spektroszkópiával vizsgáltuk. A jelzett szubsztrát analóg ( $3\text{-}^2\text{H}_2$ )etilmalonil-CoA a mobilis deutériumnak kb. 40%-át elvesztette a vízzel történő cserében, míg csak kismértékben, vagy egyáltalán nem történt deutérium beépülés a képződött metilszukcinil-CoA-ba, ha a jelzetlen analógot deutériumoxidban reagáltattuk. A ( $^2\text{H}_3$ )metilmalonil-CoA, mint szubsztrát reakcióját  $^1\text{H}$ -NMR spektroszkópiával követtük. Azt találtuk, hogy kb. 20%-a a vándorló deutériumnak elveszett a vízzel történő cserében, míg a szubsztrát 67%-a átalakult. Mivel a koenzim- $B_{12}$  mint hidrogén átvívó funkcionál az átalakulásban, sztereospecifikusan deuterált (5'R)- és (5'S)-( $5\text{-}^2\text{H}_1$ )-adenosylcobalamint állítottunk elő és inkubáltattunk *Propionibacterium shermanii*-ből származó metilmalonil-CoA-val. Az  $^1\text{H}$ -NMR spektroszkópia megmutatta az 5' pozícióban az inkubáció alatt történő deutérium veszteséget és vándorlást.

## Summary

The enzymic conversion of urocanate was followed by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy at 500 MHz in deuterium oxide. It was found (a) that urocanase promotes the exchange of the 5-hydrogen atom of the substrate faster than it catalyses the overall reaction, (b) that the product is an equilibrium mixture of racemic  $\beta$ -(5-oxoimidazol-4-yl)propionate and  $\beta$ -(5-hydroxyimidazol-4-yl)propionate and (c) that  $\beta$ -(5-oxoimidazol-4-yl)propionate is spontaneously hydrolysed under physiological conditions to *N*-formylisoglutamine. The rate of this hydrolysis is considerably diminished at  $+8^\circ\text{C}$ . It was shown by UV and  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy that  $\beta$ -(5-hydroxyimidazol-4-yl)-propionate ( $\lambda_{\max}$  234 nm) exists in protonated form at low pH (1) whereas at neutral pH (7.5) it exists in equilibrium with  $\beta$ -(5-oxoimidazol-4-yl)propionate ( $\lambda_{\max}$  269 nm).

In the coenzyme- $B_{12}$ -dependent methylmalonyl-CoA mutase reaction the hydrogen transfer was investigated by deuterium and tritium labelling and by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. The labelled substrate analogue ( $3\text{-}^2\text{H}_2$ )ethylmalonyl-CoA lost about 40% of the migrating deuterium to water, whereas little if any deuterium was incorporated into the produced methylsuccinyl-CoA when the unlabelled analogue was reacted in deuterium oxide.

The reaction with ( $^2\text{H}_3$ )methylmalonyl-CoA as substrate was monitored by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. It was found that about 20% of the migrating deuterium was lost to water when 67% of the substrate had been converted. Since coenzyme- $B_{12}$  functions as a hydrogen carrier in the rearrangement stereospecifically deuterated (5'R)- and (5'S)-( $5\text{-}^2\text{H}_1$ )adenosylcobalamins were prepared and incubated with the methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*.  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy showed that loss and scrambling of deuterium in the 5'-position occurred during incubation.

## IRODALOM

1. F. KAEPELI, J. RÉTEY, *Eur. J. Biochem.*, **23**, 198 (1971).
2. D. J. GEORGE, A. T. PHILLIPS, *J. Biol. Chem.*, **245**, 528 (1970).
3. R. M. EGAN, A. T. PHILLIPS, *J. Biol. Chem.*, **252**, 5701 (1977).
4. V. KEUL, F. KAEPELI, C. GHOSH, T. KREBS, J. A. ROBINSON, J. RÉTEY, *J. Biol. Chem.*, **254**, 843 (1979).
5. E. GERLINGER, J. RÉTEY, *FEBS Lett.*, **110**, 126 (1980).
6. E. GERLINGER, W. E. HULL, J. RÉTEY, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 692 (1981).
7. D. R. RAO, D. M. GREENBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, **43**, 404 (1960).
8. R. W. KELLERMEYER, H. G. WOOD, *Biochemistry*, **1**, 1124 (1962).
9. E. F. PHARES, M. V. LONG, S. F. CARSON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **8**, 142 (1962).
10. P. OVERATH, G. M. KELLERMAN, F. LYNEN, H. P. FRITZ, H. J. KELLER, *Biochem. Z.*, **335**, 500 (1962).
11. P. A. FREY, R. H. ABELES, *J. Biol. Chem.*, **241**, 2732 (1966).
12. M. K. ESSENBERG, P. A. FREY, R. H. ABELES, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 1242 (1971).
13. J. RÉTEY, D. ARIGONI, *Experientia*, **22**, 783 (1966).
14. G. J. CARDINALE, R. H. ABELES, *Biochim. Biophys. Acta*, **132**, 517 (1967).
15. B. M. BABIOR, *Biochim. Biophys. Acta*, **167**, 456 (1968).
16. J. RÉTEY, F. KUNZ, D. ARIGONI, T. C. STADTMAN, *Helv. Chim. Acta*, **61**, 2989 (1978).
17. J. RÉTEY, E. H. SMITH, B. ZAGALAK, *Eur. J. Biochem.*, **83**, 437 (1978).
18. M. DUPRÉ, A. GAUDEMER, *Tetrahedron Lett.*, 2783 (1978).
19. A. GAUDEMER, J. ZYLBER, N. ZYLBER, M. BARAN-MARSZAC, W. E. HULL, M. FOUNTOULAKIS, A. KÖNIG, K. WÖLFE, J. RÉTEY, *Eur. J. Biochem.* (sajtó alatt, 1981).
20. R. J. PARRY, J. C. S. *Chem. Commun.*, 294 (1978).
21. A. CHEUNG, R. PARRY, R. H. ABELES, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 384 (1980).
22. M. FOUNTOULAKIS, J. RÉTEY, W. E. HULL, B. ZAGALAK, in *Proceedings of the Third European Symposium on Vitamin B<sub>12</sub> and Intrinsic Factor* (B. Zagalak and W. Friedrich eds) pp. 169 Walter de Gruyter, Berlin (1979).



## A KÍGYÓ IDEGMÉRGEK SZERKEZET-MŰKÖDÉS ÖSSZEFÜGGÉSE

M. D. WALKINSHAW, W. SAENGER, A. MAELICKE

(Abteilung Chemie, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, D—3400 Göttingen, NSZK)

### Bevezetés

Az idegsejtek működése során az ingerületek az egyik idegsejttől a másikig, végül az izomvégződéshez jutnak el, a sejtek közötti közvetítésben az acetilkolin fontos szerepet játszik. Az egyik sejt preszinaptikus membránja bocsátja ki az acetilkolint, majd ez az anyag keresztülhalad a szinaptikus nyíláson, ezután az acetilkolin-receptorhoz kötődik; ez a receptor egy több alegységből álló fehérje, mely a szomszédos sejt posztzinaptikus membránjában található. A kötődési konstans  $10^7$  M nagyságrendű, a kapcsolódás ionok kibocsátása által a membrán depolarizációját váltja ki, az ionok viszik az ingerületet a következő szinapszishoz és így terjed az impulzus tovább [1, 2].

### A kígyó idegméreg fő szerkezeti vonásai

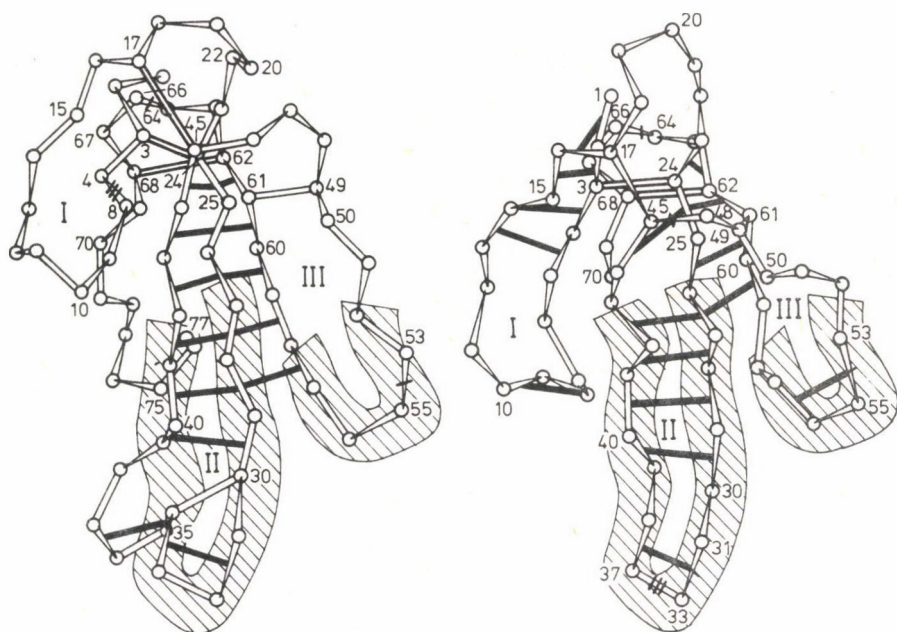
Két fő, a természetben előforduló antagonistá család ismeretes, melyek egytől négy nagyságrenddel erősebben kötődnek a receptorhoz mint az acetilkolin ezek a kuráre (nyílméreg) alkaloidok és a kuráre-szerű kígyó idegmérgek. Az utóbbiból két fajta ismeretes: az ún. rövid, mely kb. 62 aminosavból áll és az ún. hosszú, mely kb. tíz egységgel hosszabb. A mérgekben számos esetben meghatározták az aminosav sorrendet [3], a primer szerkezeteket maximális hasonlóság szerint elrendezve megállapították, hogy mindegyikben nyolc cisztein van melyek helye egymáshoz képest, és az egy további ciszteint tartalmazó „hosszú” mérgekkel összehasonlítva megegyezik. Ezenkívül mindkét fajta méregben további azonos aminosav egységek vannak, így a Tyr 25, Trp 29, Asp 31, Arg 37, Gly 38, Gly 44, Pro 50, Asn 69. Két „rövid”, kevésbé halálos méregben a 31-es aszparagin helyett glicin van.

A „rövid” és „hosszú” idegmérgekben az aminosav oldalláncokon végrehajtott kémiai módosítás azt mutatja, hogy egyetlen reakciótól a hatás nem szűnik meg teljesen, legalábbis akkor nem, ha az általános háromdimenziós szerkezet nem bomlik fel [3]. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az acetilkolin receptor és az idegméreg közötti szoros kötődésért nem egyetlen hely, hanem többpontos kapcsolódás a felelős [3, 4].

A kétfajta idegméreg háromdimenziós szerkezetének összehasonlítása, a *Laticauda semifasciata* nevű temgeri kígyóból származó „rövid” erabutoxin [4, 5] és a

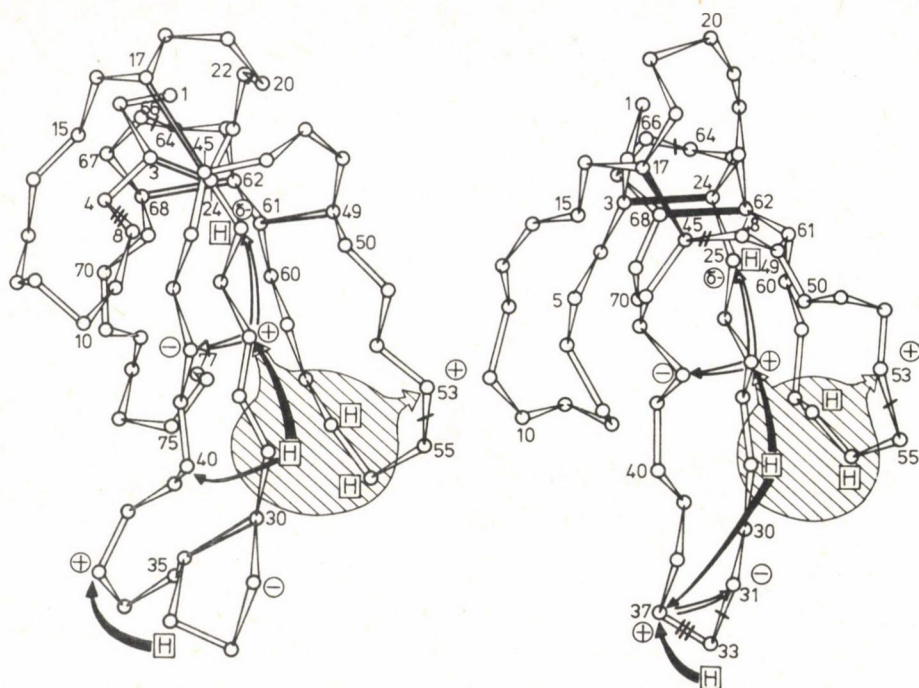
*Naja naja siamensis* (sziámi pápaszemes kobra kígyó) [6] nevű „hosszú”  $\alpha$ -kobraméreg esetében azt mutatja, hogy az alak nagy vonalakban megegyező. A négy diszulfidhíd (1. ábra) által rögzített gömbalakú központi részből három nyúlvány lóg le. A fő, központi II-es hurkot belül lépcsőszerű hidrogénhidak stabilizálják és hasonló erővel kapcsolódik a „baloldali” III-as hurokhoz. Ez a kölcsönhatás a II-es és III-as hurkokat egymáshoz képest közel párhuzamos helyzetbe kényszeríti és ezáltal egy V-alakú hasadék keletkezik. A nyílás alsó része tartalmazza Trp-29-et, egy az összes kígyó idegméregben megtalálható változatlan aminosav részt; érdekes módon ebben a pozícióban ez a sav sohasem található a szerkezetileg rokon, de működésében mégis különböző szív mérgekben [3]. Az azonos, kevésbé, illetve nem egyező aminosav alkotóelemek helyzetét összehasonlítva megállapítható, hogy az előbbieket úgy helyezkednek el, hogy oldalláncaik a nyílás belseje felé (az 1. és 2. ábrán a néző felé) mutatnak, míg a kevésbé állandó elemek a nyílás ellentétes oldalán vannak, többnyire az I-es hurokban [7], ez az a hurok, amelyik valószínűleg nem feltétlenül szükséges a működéshez [4].

A „rövid” idegméreg kristályszerkezetén alapuló, korábbi javaslat szerint az acetilkolin kvaterner nitrogénatomja és karbonil oxigénatomja közötti kb. 500 pm hosszúságú távolságot a II-es hurok alsó csúcsán levő Arg-37 — Asp-31 megfelelő



1. ábra. A röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott „hosszú” (bal oldal) és „rövid” (jobb oldal) idegmérgek lánchajlásának összehasonlítása [4, 5, 6]. A számok a Karlsson-féle nomenklatúrát [3] adják meg, a kötésekre merőleges vonalak kihagyásokat jelölnek. I, II, III római számok a fő hurkokat, a vastag vonalak a hidrogénhidakat, a kettős vonalak a diszulfid-hidakat jelölik. A pontozott területekkel a mindkét méreg típusban közös lánchajlást ábrázoljuk





2. ábra. Töltéseloszlás a „hosszú” (bal oldal) és a „rövid” (jobb oldal) idegmérgekben. Az ábrán feltüntetjük a Tyr-25 parciális negatív töltését ( $\delta^-$ ), a változatlan illetve közel változatlan aminosavak pozitív (+) és negatív (–) töltését és a hidrofób oldalláncot (H). Üres nyilakkal adjuk meg az acetil-kolin ( $N^+ \dots O_{\text{karbonil}}$ ) kb. 500 pm-es (+) és (–) közötti távolságát vastag nyilakkal pedig a kuráre-szerű alkaloidokban is megtalálható  $N^+ \dots$  hidrofób csoport távolságokat. A pontozott területek az aktív felületen belüli konkáv nyílást jelölik, a pontozott nyilak az egymástól kb. 1100 pm távolságra levő  $N^+$  töltések irányába mutatnak [7].

atomjai utánozzák, és ez a csoport felelős a méreg acetilkolin-receptorhoz való kötődéséért [4, 8]. A „hosszú” méreg szerkezetének ismeretében megállapítható, hogy számos ilyen  $N^+ \dots O$  távolság található mind a „hosszú”, mind a „rövid” méreg szerkezetében (2. ábra). Továbbá, két csak kismértékben csökkent toxicitású „rövid” méreg ismeretes, melyeknél a 31-es aszparagint glicin helyettesíti; egyponτος kapcsolódással aligha magyarázható meg a kurárenak és az idegmérgeknek az acetilkolin receptorhoz való szoros kapcsolódása. Ezért szükségesnek érezzük, hogy a kígyómérgek hatásmechanizmusának megértéséhez más elméletet keressünk.

#### *A hatás-szerkezet összefüggés tárgyalása*

A kuráre és a kígyó idegméreg közötti szerkezeti hasonlóság keresése során azt tapasztaltuk, hogy a kuráre hidrofób, konkáv felületét a V-alakú hasadék alsó része utánozza, melyben a változatlan Trp-29 helyezkedik el; ezt a hidrofób részt növeli még



a „rövid” méregben a Gly-56 és az Ile/Val-57; a „hosszú” sorozatban a Gly/Tyr-56 és a Val/Thr-57 (2. ábra). Megfelelő pozitív töltést keresve a hasadék körül több lehetőség szöba jöhet. A kapott távolságok (hidrofób felület . . .  $N^+$ ) alapján ezek vagy egy olyan kuráre-szerű izomideg blokkolónak felelnek meg, melyben csak egy kvaterner nitrogénatom van (N-metilsztrihnin és dihidro- $\beta$ -eritroidin) vagy hathatnak úgy mint maga a kuráre. Ez azért lehetséges, mert mind a „hosszú”, mind a „rövid” méreg felületén levő Lys-27 és Lys-53 úgy el tud fordulni, hogy a terminális  $N^+$  csoportok 1100 pm-re vannak egymástól, és a változatlan Trp-29-hez képest egy a kuráre alkaloidokban talált, a pozitív töltés és az aromás csoport elrendeződését utánzó struktúrát vehetnek fel. A kémiai vizsgálatok is rámutattak arra, hogy Lys-27 és 53 alapvetően fontos a hatás szempontjából, hasonlóan Trp-29, vagy más hidrofób csoport ebben a pozícióban [3]. Fel kell tételeznünk, hogy a 27-es és 53-as lizin közül egyik helyettesítése nem szünteti meg a mérgező hatást, mivel néhány kuráre-szerű anyagban csak egy pozitív töltés van. Ezt valóban megfigyelték és ezzel kapcsolatban érdekes megjegyezni, hogy nincs olyan kígyóméreg, melyben a 27-es és az 53-as lizin is helyettesítve lenne egyszerre. Összefoglalva, az acetil-kolin, kuráre (nyílméreg) és a kurárét utánzó kígyó idegmérgeknek több közös elemük van. Mindegyikben található 500 pm körüli  $N^+$  . . . O távolság és csak az antagonistáknak van ezen kívül hidrofób magjuk, melyhez egy vagy két pozitív töltés tartozik, az utóbbi esetben a töltések mintegy 1100 pm távolságra vannak egymástól. A kuráre és a kígyómérgek többpontos kapcsolódása az acetilkolin receptorhoz összhangban van az egy-egy ponton történő kémiai módosításokkal, melyek általában véve nem járnak együtt a kígyómérgek mérgező hatásának teljes megszűnésével.

### Összefoglalás

Kuráre (nyílméreg) vagy kuráre-szerű alkaloidok és a kurárét utánzó kígyó idegmérgek a poszt-szinaptikus membránban levő acetilkolin receptorhoz való erős kompetitív kötődéssel blokkolják az idegvezetést. A „hosszú” és „rövid” kígyó idegmérgek két ismert családjának röntgendifrakciós vizsgálata szerint a molekulák geometriája hasonló. Két polipeptid hurok által kialakult aktív helyet lépcsőszerű hidrogénhidak olyan V-alakú hasadék formába kényszerítik, melyek alsó részét hidrofób aminosav oldalláncok, és az ezek közül külön kiemelendő változatlan Trp-29 képezik. Az aktív hely és a hurok alsó csúcsa számos egymástól kb. 500 pm távolságra levő  $N^+$  . . . O párt tartalmaz, ezzel a távolsággal jellemezhető az acetilkolin kvaterner nitrogénatomja a karbonil oxigénatomhoz képest. A kuráre-szerű alkaloidok hidrofób, konkáv felületén levő 1100 pm-es  $N^+$  . . .  $N^+$  távolságot az idegmérgekben a Lys-27, Lys-53 és a fent említett Trp-29 megfelelő atomjai utánozzák. A kétfajta idegmérgekben levő töltések, hidrofób helyek hasonló eloszlása az acetilkolin receptorhoz való többpontos kapcsolódást támasztja alá.

### Summary

Curare, curare-like alkaloids and the curare-mimetic snake neurotoxins block nerve conduction through competitive, strong binding to acetylcholine receptor located in the postsynaptic membrane. X-ray diffraction studies of the two known families of „long” and „short” snake neurotoxins show that they have comparable geometry. The active site formed by two polypeptide loops is forced by pleated sheet hydrogen bonds into a V-shaped cleft, the bottom of which is lined by hydrophobic amino acid side chains and,

especially noteworthy, by the invariant Trp-29. The active site and the lower tip of one loop contain several  $N^+ \dots O$  pairs at about 500 pm distance as found for quaternary  $N^+$  and carbonyl oxygen in acetylcholine. The  $N^+ \dots N^+$  distance of 1100 pm and the hydrophobic, concave surface of curare-like agents are mimicked in the neurotoxins by Lys-27, Lys-53 and said Trp-29. The overall distribution of charges and hydrophobic sites common in the two types of neurotoxins suggest a multipoint attachment to the acetylcholine receptor.

## IRODALOM

1. P.-P. CHANGEUX, L. BENEDETTI, J.-P. BOURGEOIS, A. BRISSON, J. CARTAN, P. DEVAUX, H. GRÜNHAGEN, M. MOREAU, J.-L. POPOT, A. SOBEL, M. WEBER, *Cold Spring Harb. Quant. Biol.*, **40**, 211—230 (1976).
2. V. P. WHITTAKER, *Naturwiss.*, **60**, 281—289 (1973).
3. E. KARLSSON, *Handbook of Experimental Pharmacology*, **52**, 159—212 (1979).
4. B. W. LOW, *Handbook of Experimental Pharmacology*, **52**, 213—257 (1979).
5. D. TSERNOGLOU, G. A. PETSKE, *FEBS Lett.*, **68**, 1—4 (1976).
6. M. D. WALKINSHAW, W. SAENGER, A. MAELICKE, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2400—2404 (1980).
7. M. D. WALKINSHAW, W. SAENGER, A. MAELICKE, *Proc. VII. Katzir-Katchalsky Symp.*, Israel, in the press, 1981.
8. D. TSERNOGLOU, G. A. PETSKE, R. A. HUDSON, *Mol. Pharmacol.*, **14**, 710—716 (1978).



## FEHÉRJE DINAMIKA ÉS MŰKÖDÉS

SOMOGYI BÉLA

(*Biofizikai és Biokémiai Tanszék, Debreceni Orvostudományi Egyetem, 4012 Debrecen, Magyarország*)

### Bevezetés

Az enzimológia klasszikus felfogása a röntgendiffrakciós és más, a molekula szerkezetéről statikus képet adó módszerek információin alapszik. Ennek megfelelően az enzimhatás elméletével foglalkozó korai elméletek az enzimet úgy tárgyalják, hogy csak egy kis részét az ún. aktív helyet veszik figyelembe, a többi rész feladata csupán az aktív hely háromdimenziós térszerkezetének fenntartása. Az enzimnek ez a viszonylag kis része, az aktív hely, csökkenti le a szubsztrát(ok) és a végtermék(ek) közötti energia gátat.

Az enzimszerkezet dinamikus szemlélete viszont válaszolni tud majd olyan kérdésekre, mint: hogyan működnek az enzimek, milyen enzim szerkezet, működés összefüggések vannak [1—8].

### Az enzimmodellek dinamikus szemlélete

COOPER [9] szerint az egyedi fehérje molekulák olyan viszonylag kis termodinamikai rendszerek, melyek aránylag kevés részből állnak. Ezért „a termodinamikai sajátosságok statisztikus ingadozásának sokkal nagyobb jelentőséget kell tulajdonítani”. Vegyük például az (1) összefüggéssel definiált belső energia ( $U$ ) négyzetátlagának fluktuációját:

$$\overline{\delta U^2} = k_B T m c_V \quad (1)$$

(ahol  $m$  a rendszer tömege,  $V$  a térfogata,  $k_B$  a Boltzman állandó,  $T$  az abszolút hőmérséklet), az (1) egyenletbe jellemző értékeket behelyettesítve Cooper szerint fehérjemolekulánként a fluktuáció négyzetátlagának gyöke  $2,7 \times 10^{-19}$  Joule. Ez az érték 159 J/mol értéknek felel meg, ha feltételezzük, hogy oldatban minden fehérjemolekula szinkronban fluktuál.

A belső energia eloszlás harmadik momentuma ( $\delta U^3$ ) az eloszlás aszimmetriáját jellemzi. Cooper [9] ez utóbbi nagy értéke alapján azt a következtetést vonja le, hogy „az egyedi fehérjemolekulák belső energiájára a legvalószínűbb érték nem egyezik meg az átlag energiával. Másszóval, nagyszámú fehérjemolekula oldataiban a normális körülmények között észlelt állapot nem egyezik meg az egyedi molekula leg-



valószínűbb állapotával". Így, a fehérjét statikus szerkezetként leíró idő-átlag vizsgálatoktól a különböző termodinamikus paraméterekben, jelentős eltérés várható egyedi molekulákban [10, 11].

Számos, a fehérjemolekulák fentebb tárgyalt belső ingadozásán alapuló elmélet van [12—14]. Ezek közös vonása az, hogy az enzim szerkezetébe valamilyen energia-átalakító gépezetet építenek be. Ezért alapvetően fontos, hogy megértsük az energia-átalakító elv és a termodinamika második fő tétele közötti összefüggést. A második fő tétel azt mondja ki, hogy a szabadentalpia a fehérjében

$$G = H - T\Delta S \quad (2)$$

nem növekedhet.

Mint ahogy arra Kemeny [25] rámutatott, a  $H$  és  $S$  változások kompenzálódnak, azaz

$$\Delta H = T\Delta S = 0, \quad (3)$$

„ami nem azt jelenti, hogy a hőenergia szabad energiába alakul át, hanem inkább azt, hogy a belső energia átalakulása és a tartállyal való hőcsere ugyanannak a mechanizmusnak képezi részét. Az entalpia és az entrópia ingadozását illetően Kemeny arra a következtetésre jut, „hogy az energiaingadozás hő formájában kerül a testhez, mivel ez a tartálytól ered, és következtetésképpen, az hogy ebből mennyi jelentkezik egy reakció aktuális szabadsági fokában. . . statisztikus súlyozás kérdése. Ha az átalakulási folyamat befejeztével az energia ingadozás és a kompenzációs entrópia a fehérjében marad, nem sértődik meg a második főtétel”.

Az enzimműködés különböző modelljeit illetően az olvasó figyelmét néhány hivatkozásra hívjuk fel [1—24, 26—29]. Röviden két példát mutatunk be annak illusztrálására a proteinszerkezet, dinamika és környezeti paraméterek hogyan irányíthatják az enzim működéshez kapcsolt energia-átalakulások rendszert.

Az első példa a Gavish és Frauenfelder féle modell [26—29]. Ez a modell az enzimkatalizált átalakulási számot ( $k_{\text{kat}}$ ) a dinamikus fehérje-oldószer kölcsönhatás függvényében adja meg explicit formában. A modell a kémiai kinetika Kramers elméletén [30] alapul. Jelen állapotában a Gavish—Frauenfelder modell az enzim közvetített reakció sebességi állandóját módosított Kramers egyenlet formájában adja meg:

$$k \simeq \frac{A}{\eta \epsilon_s} e^{-\Delta/k_B T}, \quad (4)$$

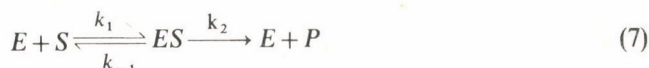
ahol  $\eta_s$  az oldószer viszkozitása,  $A$  potenciális energiaprofílt jellemző szerkezeti paraméterek függvénye,  $\Delta$  a potenciálgát magassága, míg  $\epsilon$  ( $0 \leq \epsilon \leq 1$ ) az oldószer és a fehérje közötti dinamikus csatolást írja le. Az oldószer viszkozitás követi az Arrhenius törvényt:

$$\eta_s = \eta_0 e^{E_\eta/k_B T} \quad (5)$$

A (4) egyenlet részletesebb alakban:

$$k = \frac{A}{\eta_0 \varepsilon} \exp \left\{ - \frac{\Delta + \varepsilon E_\eta}{k_B T} \right\}$$

Az enzimkatalizált reakció sebességi állandójának viszkozitás függése következtében az utóbbi tíz évben kifejlesztett modellünk [12—17] hasonló alakú. Az egyszerű Michael-féle sémát alapul véve



és új paramétereket, mint felismerési térfogat, aktiváló ütközési alak, stb., a  $k_1$ ,  $k_{-1}$  és  $k_2$  sebességi állandókra az alábbi kifejezéseket vezettük le:

$$k_1 = \frac{3}{2} \frac{D_s V_r}{r_s^2} \left[ \frac{1}{2} + \frac{r_0}{\lambda \sqrt{v}} \right]^2 \exp(-E_q/k_B T) \quad (8)$$

$$k_{-1} = P_s \frac{kT}{\pi \lambda^2 \eta \rho} [\exp(-E_d/k_B T) - \zeta \exp(-E_p/k_B T)] \quad (9)$$

$$k_2 = P_s \zeta \frac{kT}{\pi \lambda^2 \eta \rho} \exp(-E_p/k_B T) \quad (10)$$

ahol  $V_r$  a felismerési térfogat,  $\lambda$  az oldószert jellemzi,  $\eta$  a viszkozitás,  $\bar{\rho}$  az oldószert is magába foglaló sugár ( $\bar{\rho}$  függ az oldószer tömeg eloszlásától és az enzim dinamikus szerkezetétől),  $P_s$  és  $\zeta$  valószínűségi faktorok (részletesebb leírásokat az irodalomban találunk).

### A fehérje dinamika kísérleti közelítése

Mindkét fent tárgyalt modell azt sugallja, hogy a fehérje dinamikának és a fehérje-oldószer kölcsönhatásnak fontos szerepe van az enzimkatalizált folyamatokban.

Számos kísérleti technika ismeretes a fehérjemolekulák belső dinamikájának követésére. Fontos azonban megjegyezni, hogy nincsen jelenleg olyan módszer, amelyik ki tudná választani a belső mozgásnak azt a részét, amelyik az enzimkatalízishez közvetlenül járul hozzá. Kérdéses továbbá, hogy fel lehet-e ezeket a mozgásokat „fontos” és „nem fontos” részekre osztani. Ugyanakkor lényeges, hogy megbízható kísérleti bizonyítékokat találjunk, melyek az elméletbe visszacsatlakoztatva alapot szolgáltathatnak ahhoz, hogy az enzimek működéséről többet tudjunk meg. Ez a megközelítés a katalitikus és (vagy) szabályozó paraméterek, továbbá a termodinami-



kai és (vagy) más fizikai paraméterek ingadozása közötti összefüggések keresését jelenti az enzimekben.

Másik lehetőség az, ha megfelelő kísérleteket végzünk fehérjemolekulákon. Az utóbbira kitűnő példát nyújt Frauenfelder és csoportjának munkája [29]. Lézersugárral, szinkronizált módon kötött ligandumot ( $O_2$  vagy  $CO$ ) szakítanak le a mioglobinnal, és optikailag követik az újrakötődést. Ennek a kísérleti technikának a felhasználásával a ligandum újrakötődést többszörös gát kinetikával tudták leírni. Ugyanennek a technikának az alkalmazása egy teljes enzimkatalizált reakcióra, azaz az enzim-molekulák szinkronizálása oldószerben, jelenleg még számos problémába ütközik. Ezért szükség van még a másik módszerre, azaz az enzimek katalitikus és fizikai paraméterei közötti összefüggések keresésére. Ezt a lehetőséget figyelembe véve néhány enzim katalitikus sebességi állandója és aktivációs térfogata ( $\Delta V^\ddagger$ ) közötti kapcsolatra Low és Somero [20, 21] mutattak rá, akik a nyomás és különböző sóknak sebességi állandókra gyakorolt hatását tanulmányozták. Vizsgálataikból azt a következtetést vonták le, hogy a felületen levő aminosav csoportoknak a fehérje belsejébe(ből) való átmenete az enzimátikus folyamatok sebességmeghatározó lépése során megváltoztatja a katalízis energetikai jellemzőit (pl. az aktiválási szabad energiát). Ugyanezt a kérdést Matkó és munkatársai más, hasonló úton közelítették meg [31], melynek során fluoreszcenciás technikát alkalmaztak. Eftink és Ghiron szerint [32], akik ribonukleáz  $T_1$ -ben a triptofán tag akrilamid „Quenchelését” (hirtelen kifagyasztást) tanulmányozták. Ez az ütközéses quenchelés alkalmas arra, hogy a fehérje mátrix belső váltakozását jellemezzük. Ebből kiindulva Matkó és munkatársai [31] tanulmányozták milyen hatást gyakorol a triptofán fluoreszcenciájára és a foszforiláz nyúl vázizom enzim katalitikus paramétereire az akrilamid. Az akrilamid fluoreszcenciára gyakorolt hatását a Ster—Volmer egyenlet alapján vizsgálták:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q], \quad (11)$$

ahol  $[Q]$  a kifagyasztó, azaz az akrilamid koncentrációja,  $F_0$  és  $F$  fluoreszcencia intenzitások kifagyasztás előtt és után.  $K$  a kifagyasztás természetétől függ. Dinamikus kifagyasztásnál, mint ahogy az a fluoreszcenciás élettartam mérések bizonyítják, a kifejezés alakja:

$$K = k_q \tau, \quad (12)$$

ahol  $k_q$  a gerjesztett fluorofor és a kifagyasztó molekula-pár képződés bimolekuláris sebességi állandója,  $\tau$  pedig a fluorofor egyszeri élettartama (itt feltesszük, hogy a kifagyasztás határfoka 1).

A fenti rendszer fluoreszcenciás tulajdonságának elemzése szerint a kifagyasztás ütközéses típusú. Továbbá, a Stern—Volmer egyenlet módosított alakja azt igazolta, hogy a foszforiláz  $b$  esetében monomerenkénti mind a 12 triptofán hozzáférhető a kifagyasztó akrilamid számára. Ez határozottan arra utal, hogy a fagyasztó molekulák az enzim-molekulákba valószínűleg a protein mátrix belsejében végbemenő belső



változások során kialakuló áteresztő „lyukakon”, „mikroösvényeken” keresztül hatolnak be. További vizsgálatok azt mutatták, hogy a fagyás teljesen megfordítható és (0,05M koncentrációig) a kifagyasztó az enzim termikus stabilitását nem befolyásolja.

Ugyanebben az időben végzett független kísérletek fényt derítettek arra, hogy az akrilamid az enzim maximális sebességét ( $V_m$ ) lecsökkenti, ugyanakkor változatlanul hagyja a szubsztrát (glükóz-1-foszfát, glikogén) és az alloszterikus aktivátor (adenozin-5'-monofoszfát) kapcsolódás erősségét. Ez arra utal, hogy az akrilamid kompetitív inhibitorként viselkedik.

Az akrilamid gátló és befagyasztó hatását a foszforiláz b enzimen összehasonlítva, azaz a  $\frac{V_0}{V}$  értéket az  $\frac{F_0}{F}$  függvényében ábrázolva jó lineáris összefüggést kapunk ( $V_0$  és  $V$  maximális sebességek,  $F_0$  és  $F$  fluoreszcencia intenzitások akrilamid nélkül, illetve jelenlétében). Ez arra utal, hogy a foszforiláz b belsejében levő fluktuáció (melyet az akrilamid molekulák zavarnak meg) legalábbis részben erősen kapcsolatban áll a katalízissel (illetve annak szükséges feltétele). További kísérleti munkára van szükség, hogy többet tudjunk meg a foszforiláz B, és más enzimek katalitikus működésében az ingadozások szerepéről. Matkó és munkatársai [31] módszerével az egész fehérjemolekula átlagára kaptunk információt. A probléma megoldása céljából olyan módszerre van szükség, mely a helyi ingadozások követésére alkalmas. Ebből a szempontból a Förster típusú rezonancia energia átmenet tűnik a fehérje mátrix helyi változásának tanulmányozására ígéretes módszernek [33].

Összefoglalva megállapítható, hogy vannak új, illetve felújított „régí” módszerek melyekkel az enzimek működését és szabályozását leíró újabb dinamikus modelleket elemezhetjük. A kísérleti és elméleti eredményeket elemezve kitűnik, hogy mindkét módszernek vannak korlátai. Előre jutni csak a két módszer együttes alkalmazásával lehet. Csak így ismerhetjük meg egyre jobban az enzimek működését, de ennek segítségével érthetjük meg az enzimek kölcsönhatását, pl. többenzimes rendszerben, és végül eljuthatunk a sejt működés molekuláris szintű felderítéséhez.

### Összefoglalás

Számos molekulára jellemző a fluktuáló (váltakozó) viselkedés. Mivel az enzimatis aktivitás számos fehérje jellemző működési tulajdonsága, érthető az a feltevés, hogy a szerkezetfüggő ingadozás az enzimaktivitásban és -szabályozásban fontos szerepet játszik. Ezt a feltevést számos elméleti modell és kísérleti eredmény támasztja alá. A fehérje-dinamika és az enzimműködés közötti helyes összefüggés feltárásához további kísérleti munkára van szükség. A közleményben a fenti probléma teljesebb megértésének elméleti és kísérleti lehetőségeit tárgyaljuk.

### Summary

Fluctuational behaviour is a characteristic property of the collections of different molecules. Since the enzyme activity is an inherent functional property of many proteins it is natural to assume that structure dependent fluctuations should play an important role in enzyme activity and regulation. Several theoretical

models along with extant experimental results stress the above assumption. However, to find the correct interrelationship between protein dynamics and enzyme function further experimental work is required. The paper will discuss both theoretical and experimental possibilities to get a better understanding of the above question.

## IRODALOM

1. CARERI, G., FASELLA, P., GRATTON, E.: *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **3**, 141 (1975).
2. CARERI, G., FASELLA, P., GRATTON, E.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **8**, 69 (1979).
3. CARERI, G.: in: *Quantum Statistical Mechanics in the Natural Sciences* (B. Kursunoglu, S. L. Mintz, S. M. Widmayer, eds) Plenum Press, New York, p. 15 (1974).
4. GURD, F. R. N., ROTHGEB, R. M.: *Adv. Protein Chem.*, **33**, 73 (1979).
5. KARPLUS, M., MCCAMMON, J. A.: *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **9**, 293 (1981).
6. MCCAMMON, J. A., KARPLUS, M.: *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **31**, 29 (1980).
7. WEBER, G.: *Adv. Protein Chem.*, **29**, 1 (1975).
8. DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B.: in: *New Trends in the Description of the General Mechanism and the Regulation of Enzymes* (S. Damjanovich, P. Elődi, B. Somogyi, eds.) *Symposia Biologica Hungarica*, **21**, 159—184 (1978). Akadémiai Könyvkiadó, Budapest, 1978.
9. COOPER, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 2740 (1976).
10. FRAUNFELDER, H., PETSKO, G. A., TSERNOGLOU, D.: *Nature*, (London) **280**, 558 (1979).
11. ARTYMIUK, P. J., BLAKE, C. C. F., GRACE, D. E. P., OATLEY, S. J., PHILLIPS, D. C., STERNBERG, M. J. E.: *Nature* (London) **280**, 563 (1979).
12. SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 353 (1971).
13. SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: *Proc. First Eur. Biophys. Congr.*, **6**, 127 (1971). WMA Verlag.
14. SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: *J. Theor. Biol.*, **48**, 393 (1975).
15. SOMOGYI, B., KARASZ, F. E., TRÓN, L., COUCHMAN, P.: *J. Theor. Biol.*, **74**, 209 (1978).
16. DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B.: *Proc. First Eur. Biophys. Congr.*, **6**, 133 (1971). WMA Verlag.
17. DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B.: *J. Theor. Biol.*, **41**, 567 (1973).
18. VOLKENSTEIN, M. V.: *J. Theor. Biol.*, **34**, 193 (1972).
19. DAVYDOV, A. S.: *J. Theor. Biol.*, **66**, 379 (1977).
20. LOW, P. S., SOMERO, G. N.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3014 (1975).
21. LOW, P. S., SOMERO, G. N.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3305 (1975).
22. GREEN, D. E., JI, S.: *Bioenerget.*, **3**, 159 (1972).
23. GREEN, D. E., JI, S.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 904 (1973).
24. CASERTA, G., CERVIGNI, T.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4421 (1974).
25. KEMENY, G.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2655 (1974).
26. GAVISH, B.: *Biophys. Struct. Mechanism*, **4**, 37 (1978).
27. GAVISH, B.: *Phys. Rev. Lett.*, **44**, 1160 (1980).
28. GAVISH, B.: *Fed. Proc. Biophys. Soc. 24th Annual Meeting Abstract*, No. 822 (1980).
29. BEECE, D., EISENSTEIN, I., FRAUNFELDER, H., GOOD, D., MARDEN, M. C., REINISCH, L., REYNOLDS, A. H., SORENSEN, L. B., YUE, K. T.: *Biochemistry*, **19**, 5147 (1980).
30. KRAMERS, H. A.: *Physica*, **7**, 284 (1940).
31. MATKÓ, J., TRÓN, L., BALÁZS, M., HEVESSY, J., SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: *Biochemistry*, **19**, 5782 (1980).
32. EFTINK, M. R., GHIRON, C. A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3290 (1975).
33. HEVESSY, J., SOMOGYI, B., WELCH, G. R., PAPP, S., MATKÓ, J., DAMJANOVICH, S.: *Int. J. Luminescence*, (1981). (közlés alatt).



## СОДЕРЖАНИЕ

### ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ В БИОМОЛЕКУЛАХ

Международный Симпозиум,  
г. Эгер Венгрия, 58 октября 1981 г.

<i>Стезовски Й. Й.</i> : Пространственные эффекты — Внутримолекулярный перенос информации в антибиотиках тетрациклина .....	2
<i>Ваинштейн Б. К., Тищенко Г. Н., Жуклистова Н. Е., Караулов А. И., Смирнова В. И.</i> : Исследование антибиотиков серии энниатина и валиномицина: структурные аспекты ионного транспорта с помощью энниотина Б. ....	10
<i>Вебер Х. П., Лузли Х. Р., Печер Т. Й.</i> : Конформация дигидроэргопептинов в кристалле и растворе .....	26
<i>Ричардс В. Г.</i> : Значение неравновесной конформации молекул с фармацевтическим действием .....	35
<i>Претч Е., Бендл Й., Портман П., Велти М.</i> : Применение квантовохимических расчетов в планировании ионных носителей .....	47
<i>Волтер В., Ветхавиясар Н.</i> : Стереохимия и биологическое действие гормонов гипоталамуса	61
<i>Баюс Ш.</i> : Взаимодействия между боковой цепью и функциональными группами, влияющими на биологическую активность пептидов .....	75
<i>Вамхофф Х.</i> : Модельные реакции для изучения электронных, пространственных и других эффектов в циклоаддиционных реакциях нуклеиновых кислот .....	89
<i>Шнацке Г.</i> : Экспериментальное определение конформации биомолекул с помощью циркулярного дихроизма. ....	106
<i>Крамер Ф., Вон дер Хар Ф., Штернбах Х., Габиус Х. Й., Гразер Е., Вемейер Г., Фрейст В.</i> : Аминоацилирование тРНК — Как надежно работают энзимы? .....	115
<i>Пуллман Б.</i> : Сравнение доступности и молекулярного электростатического потенциала в Б- и З-ДНК .....	121
<i>Пуллман А.</i> : Сравнение доступности и молекулярного электростатического потенциала в молекуле тРНК <sup>Фе</sup> .....	129
<i>Полгар Л.</i> : Стереохимия энзимного катализа .....	136
<i>Йордан Ф., Полгар Л., Тоуш Г.</i> : Изучение активного места субтилизина и тиолсубтилизина с помощью протон ЯМР с большим полем .....	143
<i>Захрадник Р., Хобза П., Сауер Й.</i> : Роль структурных и энергетических факторов в биологическом катализе .....	155
<i>Ретей Й.</i> : Изучение механизма влияния энзимов .....	168
<i>Валкиншо М. Д., Сангер В., Малицке А.</i> : Связь между структурой и действием змеиных нервных ядов .....	185
<i>Шомоди Б.</i> : Динамика и действие белков .....	190



# CONTENS

## STERIC EFFECTS IN BIOMOLECULES

International Symposium,  
Eger Hungary, October 5-8, 1981

<i>Stezowski, J. J.</i> : Steric effects—Intramolecular information transfer in tetracyclin antibiotics . . .	2
<i>Vainshtein, B. K., Tishchenko, G. N., Zhukhlistova, N. E., Karaulov, A. I., Smirnova, V. I.</i> : Investigations of antibiotics of enniatin and valinomycin series: structural aspects of ion transport by enniatin B . . . . .	10
<i>Weber, H. O., Loosli, H. R., Petcher, T. J.</i> : The conformation of dihydroergopeptines in the crystal and solution . . . . .	26
<i>Richards, W. G.</i> : The importance of non-equilibrium conformations of pharmacologically active molecules . . . . .	35
<i>Pretsch, E., Bendl, J., Portman, P., Weltri, M.</i> : Application of quantum chemical calculations in the designe of ion carriers . . . . .	47
<i>Voelter, W., Vethaviasar, N.</i> : Stereochemistry and biological activity of hypothalamic hormones . . . . .	61
<i>Bajusz, S.</i> : Interdependence between side chains and functional groups affecting the biological activity of peptides . . . . .	75
<i>Wamhoff, H.</i> : Some model reactions for studying electronic, steric and other effects on the photocycloadditions to nucleic acids . . . . .	89
<i>Snatzke, G.</i> : Experimental determination of the conformation of biomolecules by circular dichroism . . . . .	106
<i>Cramer, F., von der Haar, F., Sternbach, H., Gabius, H. J., Graeser, E., Wehmeyer, G., Freist, W.</i> : The aminoacylation of tRNA—How reliably can enzymes operate . . . . .	115
<i>Pullman, B.</i> : Accessibility versus molecular electrostatic potential an B- and Z-DNA . . . . .	121
<i>Pullman, A.</i> : Accessibility versus molecular electrostatic potential in tRNA <sup>Phe</sup> . . . . .	129
<i>Polgár, L.</i> : Stereochemistry of enzyme catalysis . . . . .	136
<i>Jordan, F., Polgár, L., Tous, G.</i> : High field proton nuclear magnetic resonance studies on the active site of subtilisin and thiolsubtilisin . . . . .	143
<i>Zahradnik, R., Hobza, P., Sauer, S.</i> : The role of structural and energetical constituents in biological catalysis . . . . .	155
<i>Rétey, J.</i> : Investigations on the mechanism of enzyme action by kinetic NMR . . . . .	168
<i>Walkinshaw, M. D., Saenger, W., Maelicke, A.</i> : Structure-function relationship of snake neurotoxines . . . . .	185
<i>Somogyi, B.</i> : Protein dynamics and function . . . . .	190

# MAGYAR TUDOMÁNY

A Magyar Tudományos Akadémia Értesítője

*Főszerkesztő: Straub F. Brunó*

Különböző tudományágak általános érdekű kérdéseivel foglalkozik. Minden szám tartalmaz vitákat, akadémiai híreket, a tudományos élet eseményeinek beszámolóit, megemlékezéseket, valamint könyvbírálatokat.

*Alapítva: 1890*

*Magyar nyelven, angol, francia, német  
és orosz nyelvű tartalomjegyzékkel*

*Megjelenik havonta*

*Évi előfizetési díja: 108,- Ft*

*Előfizethető a Posta Központi Hirlap Irodánál*

*Budapest, József nádor tér 1. 1051*

*Pénzforgalmi jelzőszám: 215-96162*

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

*A Magyar Tudományos Akadémia  
IX. Osztályának új folyóirata a*

## **TÁRSADALOMKUTATÁS**

Főszerkesztő: Kulcsár Kálmán

A folyóirat évente négy alkalommal, összesen 480 oldal terjedelemben jelenik meg. A szerkesztő bizottság arra törekszik, hogy a folyóiratban a társadalom folyamatait, aktuális jelenségeit feltáró cikkek, tanulmányok, tehát a társadalomkutatás új eredményei lássanak napvilágot, hozzájárulva a korszerű társadalmi gyakorlat kialakításához.

A *Társadalomkutatás* igyekszik gyorsan reagálni a társadalom életében jelentkező problémákra; interdiszciplináris jellegű, a gazdaság-, valamint az állam- és jogtudományok mellett a szociológia, a politikatudomány, a demográfia, a statisztika és a szervezéstudomány körébe tartozó közleményeket, vitákat, kongresszusi beszámolókat és könyvismertetéseket ad közre.

*Évi előfizetési díja 72,— Ft  
Egy szám ára 18,— Ft*

*Előfizethető a Posta Központi Hírlap Irodánál  
(Budapest, 1900)  
Példányonként megvásárolható a hírlapboltokban  
és az újságpavilonokban.*



# MAGYAR FIZIKAI FOLYÓIRAT

A Magyar Tudományos Akadémia  
III. Osztályának fizikai közleményei

*Szerkeszti: Pál Lénárd*

A Magyarországon folyó fizikai kutatások legújabb eredményeit ismerteti, tájékoztat a fizikai kutatások jelenlegi irányairól. Kandidátusi értekezéseket és doktori disszertációkat tesz közzé, közli magyar kutatók idegen nyelvű külföldi folyóiratokban megjelent publikációinak adatait, valamint a IUPAP híreit. „A klasszikus irodalomból” című rovatában a fizika témák szerint csoportosított mesterművei találhatók.

*Alapítva: 1953*

*Magyar nyelven*

*Megjelenik évente 1 kötet, 3 füzetben*

*Évi előfizetési díja: 90,- Ft*

*Előfizethető az Akadémiai Kiadónál*

*Budapest, Alkotmány utca 21. 1054*

*Pénzforgalmi jelzőszám: 215-11488*

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

A kiadásért felelős az Akadémiai Kiadó és Nyomda főigazgatója

Műszaki szerkesztő: Sándor István

A kézirat a nyomdába érkezett: 1983. III. 28. — Terjedelem: 17,15 (A/5) ív  
83.11926 Akadémiai Kiadó és Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Hazai György



## TARTALOMJEGYZÉK

## „Sztérikus hatások a biomolekulákban” szimpózium előadásai

Stezowski, J. J.: Térbeli hatások — A molekulán belüli információátvitel tetraciklin antibiotikumban . . . . .	2
Vainstein, B. K., Tiscsenko, G. N., Zsuklisztova, N. E., Karaulov, A. I., Szmirnova, V. I.: Enniatin és Valinamicin sorba tartozó antibiotikumok vizsgálata: Az Enniatin B segítségével történő ionszállítás szerkezeti szempontjai . . . . .	10
Weber, H. P., Loosli, H. R., Petcher, T. J.: Dihidroergopeptinek konformációja kristályban és oldatban . . . . .	26
Richards, W. G.: Farmakológiai hatású molekulák nem-egyensúlyi konformációjának jelensége . . . . .	35
Pretsch, E., Bendl, J., Portman, P., Welte, M.: Kvantumkémiail számítások alkalmazása ionhordozók tervezésében . . . . .	47
Voelter, W., Vethaniasar, N.: Hipotalamusz hormonok sztereokémiai és biológiai hatása . . . . .	61
Bajusz S.: Peptidek biológiai aktivitását befolyásoló oldallánc-funkciócsoport kölcsönhatások . . . . .	75
Wamhoff, H.: Modellreakciók elektronikus, sztérikus és egyéb effektusok tanulmányozására nukleinsavak cikloaddíciós reakcióiban . . . . .	89
Snatzke, G.: Biomolekulák konformációjának kísérleti meghatározása cirkuláris dikroizmussal . . . . .	106
Cramer, F., Von der Haar, F., Sternbach, H., Gabius, H. J., Graeser, E., Wehmeyer, G., Freist, W.: tRNS aminoacilezése. Mennyire megbízhatóan működnek az enzimek? . . . . .	115
Pullman, B.: Megközelíthetőség és molekuláris elektrosztatikus potenciál összevetése B- és Z— DNS-ben . . . . .	121
Pullman, A.: Megközelíthetőség és molekuláris elektrosztatikus potenciál összevetése tRNS <sup>Phe</sup> molekulában . . . . .	129
Polgár L.: Az enzimkatalízis sztereokémiája . . . . .	136
Jordan, F., Polgár L., Tous, G.: A szubtilizin és tiolszubtilizin aktív helyének vizsgálata nagytérerejű proton mágneses magrezonanciával . . . . .	143
Zahradnik, Hobza, P., Sauer, J.: Szerkezeti és energetikai tényezők szerepe a biológiai katalízisben . . . . .	155
Rétey, J.: Az enzimhatás mechanizmusának tanulmányozása kinetikus NMR vizsgálattal . . . . .	168
Walkinshaw, M. D., Saenger, W., Maelicke, A.: A kígyó idegmérgek szerkezet-működés összefüggése . . . . .	185
Somogyi B.: Fehérje dinamika és működés . . . . .	190

Megjelent 1984.

Index: 26.406

ISSN 0022—9814